

# **Charakterisierung kleiner überzähliger Markerchromosomen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Angela Nietzel  
geboren am 01.11.1975 in München

1. Gutachter: Prof. Dr. Claussen
2. Gutachter: Prof. Dr. Jirikowski
3. Gutachter: Prof. Dr. Diekmann

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.10.2003

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Einführung in Zytogenetik</b>	<b>2</b>
1.1.1	Klassische Zytogenetik	2
1.1.2	Bänderungs- Zytogenetik	2
1.1.3	Molekulare Zytogenetik	3
<b>1.2</b>	<b>Markerchromosomen</b>	<b>6</b>
1.2.1	Bedeutung von Markerchromsomen	7
1.2.2	Morphologie von Markerchromosomen	8
1.2.2.1	Zentromere	9
1.2.2.2	Zentromer- DNA	9
1.2.2.2.1	$\alpha$ - Satelliten- DNA	9
1.2.2.2.2	Klassische Satelliten- DNA	10
1.2.2.2.3	$\beta$ - Satelliten DNA	11
1.2.2.3	Heteromorphismus des zentromerischen Heterochromatins	11
1.2.2.4	Marker ohne alphanoid DNA	11
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Sonden</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Fälle mit kleinen Markerchromosomen</b>	<b>15</b>
2.2.1	Pränatal	15
2.2.2	Postnatal	17
2.2.3	Tumor	17
2.2.4	Fälle mit HSR-Markern	17
<b>2.3</b>	<b>Verwendete Reagenzien, Lösungen, Puffer und Medien</b>	<b>19</b>
2.3.1	Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten	19
2.3.2	Reagenzien für die PCR	19
2.3.3	Reagenzien für die Quantifizierung, Fragmentlängenbestimmung und den Dnase-Verdau	20
2.3.4	Reagenzien für die Nicktranslation	20

---

2.3.5	Verwendete dUTP und Antikörper	20
2.3.6	Reagenzien für die FISH	22
2.3.7	Puffer, Lösungen, Medien und Sonstiges	22
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Herstellung zytogenetischer Präparate</b>	<b>24</b>
3.1.1	Zellkultur	24
3.1.1.1	Lymphozytenkultur	24
3.1.1.2	Kultivierung von Amniozyten bzw. Zelllinien	24
3.1.2	Präparation von Chromosomen	24
3.1.2.1	Colcemid- Behandlung	24
3.1.2.2	Präparation von Metaphasechromosomen	25
3.1.2.3	Auftropfen der Suspension auf den Objektträger	25
3.1.3	Bänderungs- Zytogenetik	26
<b>3.2</b>	<b>Molekulargenetische Techniken zur Markierung der Sonden</b>	<b>27</b>
3.2.1	Nick Translation zum Einbau von ligandentragenden dNTP	27
3.2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.2.2.1	DOP- PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-)	29
3.2.2.2	Markierungs- PCR	32
3.2.3	Quantifizierung der PCR- Produkte und Bestimmung der Fragmentlänge der PCR- Produkte	33
3.2.4	Verkürzung der Fragmente mit DNase I	33
<b>3.3</b>	<b>In <i>situ</i> Hybridisierung an DNA</b>	<b>34</b>
3.3.1.1	DNA- Sonden	34
3.3.1.2	Vorbehandlung von Chromosomenpräparaten	35
3.3.1.3	Fällung der DNA	35
3.3.1.4	Denaturierung und Prähybridisierung von DNA- Sonde und Ziel- DNA auf dem Objektträger	36
3.3.1.5	Die eigentliche in <i>situ</i> Hybridisierung	37
3.3.1.6	Die Posthybridisierungswaschungen	37
3.3.1.7	Die Sonden- Detektion	37
3.3.1.8	Die Gegenfärbung und das Haltbarmachen der Präparate	38
3.3.1.9	Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation	39

---

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Vorarbeiten für die Etablierung der Methode</b>	<b>40</b>
4.1.1	Hybridisierung einzelner Zentromersonden	40
4.1.2	Amplifizierung und Markierung der DNA- Sonden mittels DOP- PCR	40
4.1.3	Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe	41
4.1.4	Quantifizierung der eingesetzten DNA- Mengen und Überprüfung der Fragmentlängen mittels Elektrophorese	42
4.1.5	Optimierung des Signal- Hintergrund- Verhältnisses	42
4.1.6	Der Einsatz von COT- 1- DNA	43
<b>4.2</b>	<b>Etablierung verschiedener zentromerspezifischer M-FISH- Verfahren</b>	<b>43</b>
4.2.1	Etablierung des cenM-FISH	44
4.2.1.1	Anpassung der Konzentrationen und Auswahl der Farbkombinationen	44
4.2.1.2	Test der Methode an normalen Chromosomen	45
4.2.2	Etablierung des cenM54-FISH	47
4.2.3	Etablierung des AcroCenM-FISH	48
4.2.4	Kombination von cenM-FISH und M-FISH (cenMM-FISH)	49
<b>4.3</b>	<b>Einsatz der Methoden zur Diagnostik in der molekularen Zytogenetik</b>	<b>51</b>
4.3.1	Fälle mit kleinen Markerchromosomen	52
4.3.1.1	Pränatal	52
4.3.1.2	Postnatal	57
4.3.1.3	Tumor	58
4.3.2	Fälle mit HSR- Markern	59
<b>4.4</b>	<b>CenM-FISH in der Interphase</b>	<b>61</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>64</b>
<b>5.1</b>	<b>Anmerkungen zur Methodik</b>	<b>64</b>
5.1.1	Amplifikation der DNA-Sonden	64
5.1.2	Zentromere mit gleichen oder ähnlichen alphoiden Subfamilien	64
5.1.3	Der Einsatz von Cot- 1- DNA	65

---

<b>5.2</b>	<b>Klinische Relevanz der etablierten Techniken</b>	<b>66</b>
5.2.1	cenM-FISH	68
5.2.1.1	Fälle mit partieller Trisomie 8	69
5.2.1.2	Akrozentrische Marker	70
5.2.1.3	Sonstige Fälle	73
5.2.1.4	Fälle aus der Tumorzytogenetik	74
5.2.1.5	Fälle mit Ringchromosomen	77
5.2.2	Exaktere Charakterisierung von akrozentrischen Markerchromosomen	78
5.2.2.1	CenM54-FISH	78
5.2.2.2	AcroCenM-FISH	79
<b>5.3</b>	<b>Kombination von cenM-FISH mit M-FISH</b>	<b>80</b>
<b>5.4</b>	<b>Einschränkungen</b>	<b>81</b>
<b>5.5</b>	<b>Ausblicke in die Zukunft</b>	<b>82</b>
5.5.1	subcenM-FISH	82
5.5.2	UPD- Analysen	82
5.5.3	Fast- FISH	83
5.5.4	Anwendung der cenM-FISH in der Interphase- FISH	83
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>115</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>117</b>
<b>11</b>	<b>PUBLIKATIONS LISTE</b>	<b>118</b>
<b>12</b>	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>120</b>

## 1 Einleitung

Kleine überzählige Markerchromosomen spielen in der zytogenetischen bzw. molekularzytogenetischen Diagnostik eine große Rolle. Von entscheidender Bedeutung sind sie vor allem auch in der Pränataldiagnostik, wo eine Risikoabwägung bezüglich Fehlbildungen beim Embryo besonders wichtig, aber auch schwierig ist. Mit den bisherigen Methoden der Bänderungszytogenetik gelingt es nur selten, ein vorhandenes SMC (small supernumerary marker chromosome = SMC) zu charakterisieren. Seit es möglich ist, spezifische DNA-Sequenzen mit Fluoreszenzmolekülen zu markieren und zu detektieren (Fluoreszenz in situ Hybridisierung = FISH), haben sich vielfältige neue Möglichkeiten ergeben. Mit Hilfe von Zentromersonden (sukzessive Hybridisierung), dem M-FISH- oder SKY-Verfahren (simultane Detektion aller menschlichen Chromosomen unter Verwendung von Ganzchromosomensoniden) sowie der Mikrosezierung des Markers mit anschließender Amplifikation und Hybridisierung auf normale Metaphasechromosomen, war es vor Beginn der vorliegenden Arbeit möglich, SMC in den meisten Fällen zu charakterisieren. Die genannten Verfahren können jedoch nicht in allen Labors durchgeführt werden, da sie häufig sehr zeitaufwendig sind, die technische Ausrüstung fehlt oder zu wenig Zellmaterial vorhanden ist. Aus diesem Grund gab es die Notwendigkeit, ein Verfahren zu entwickeln, welches mit wenig Zellmaterial, geringem Zeitaufwand sowie mit der bisherigen technischen Ausrüstung der meisten molekularzytogenetischen Labore zu bewerkstelligen ist. Das Thema dieser Arbeit ist die Entwicklung diagnostischer Verfahren zur simultanen Detektion aller oder ausgewählter menschlicher Zentromere im Zusammenhang mit der Charakterisierung von kleinen überzähligen „Markerchromosomen“. Anhand von ausgewählten Fällen von Patienten mit SMC wurde demonstriert, dass die Etablierung dieser Verfahren in der molekularen Zytogenetik (in der Pränatal- wie auch in der Postnataldiagnostik und der Tumorzytogenetik) gelungen ist.

## 1.1 Einführung in Zytogenetik

Die Anfänge der Zytogenetik (=Chromosomenforschung) reichen bis in das 19. Jahrhundert zurück. Einen Meilenstein zur modernen Zytogenetik erlangten Tjio und Levan sowie Ford und Hamerton 1956. Ihnen gelang erstmals die genaue Bestimmung der Zahl ( $n=46$ ) und eine morphologische Beschreibung der menschlichen Chromosomen.

Die Entwicklung der Zytogenetik kann in 3 Abschnitte unterteilt werden, die im Folgenden dargestellt werden.

### 1.1.1 Klassische Zytogenetik

Die Zeit der klassischen Zytogenetik reicht vom Ende des 19. Jahrhunderts bis in die späten 60er Jahre des 20. Jahrhunderts. In diesem Zeitabschnitt wurden die Chromosomen im Allgemeinen durchgängig einfarbig markiert (Giemsa, Orcein, usw.) und nach ihrer Größe sowie der Zentromerposition unterschieden. Wichtige Meilensteine waren hier die Entdeckung des Colchizins zur Arretierung des Zellzyklus in der Metaphase (Levan, 1938), die Einführung der hypotonen Behandlung mitotischer Zellen zur besseren Chromosomenspreitung (Hsu, 1952 und Hughes, 1952) sowie die Anwendung von Phythämagglutinin (PHA) zur Stimulierung der Zellteilung von Blutlymphozyten (Moorehead et al., 1960). Bereits zu dieser Zeit wurden Chromosomenaberrationen als Ursache des Down- und des Klinefelter-Syndroms beschrieben (Lejeune et al., 1959; Ford et al., 1959).

### 1.1.2 Bänderungs- Zytogenetik

Die Anfänge der Bänderungszytogenetik gehen auf Dr. Lore Zech in der Arbeitsgruppe von T. Caspersson zurück. 1968 gelang es dieser Arbeitsgruppe mit der Quinacrin- Bänderung erstmals, jedes einzelne Chromosom eindeutig identifizierbar zu machen (Caspersson et al. 1968, 1970a, 1970b). Die von Seabright 1971 beschriebene Chromosomenbänderung mit Giemsa ist bis heute noch Standardtechnik der Zytogenetik.

Im Weiteren wurden unter anderem noch Bänderungsverfahren zur Darstellung des konstitutiven Heterochromatins (C- Banden- Färbung) (Sumner et al., 1971)



und zur Darstellung der Nukleolus-organisierenden Regionen (NORs) auf den kurzen Armen der akrozentrischen Chromsomen (Goodpasture and Bloom, 1975) entwickelt.

Mit Hilfe der genannten Techniken ist es möglich, numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen zu beschreiben. Allerdings hängt die Qualität der Bänderung und damit auch die Aussagefähigkeit stark vom Chromosomenmaterial bzw. von äußeren Bedingungen ab. Kleinere Deletionen oder Inversionen bzw. kleine „Markerchromosomen“ können oft nicht eindeutig identifiziert werden.

Die Nomenklatur für die Beschreibung von chromosomalen Aberrationen orientiert sich weltweit an der Giemsa- Bänderung und ist im „international system for human cytogenetics nomenclature“ (=ISCN) 1995 (Mitelman, 1995) zusammengefasst.

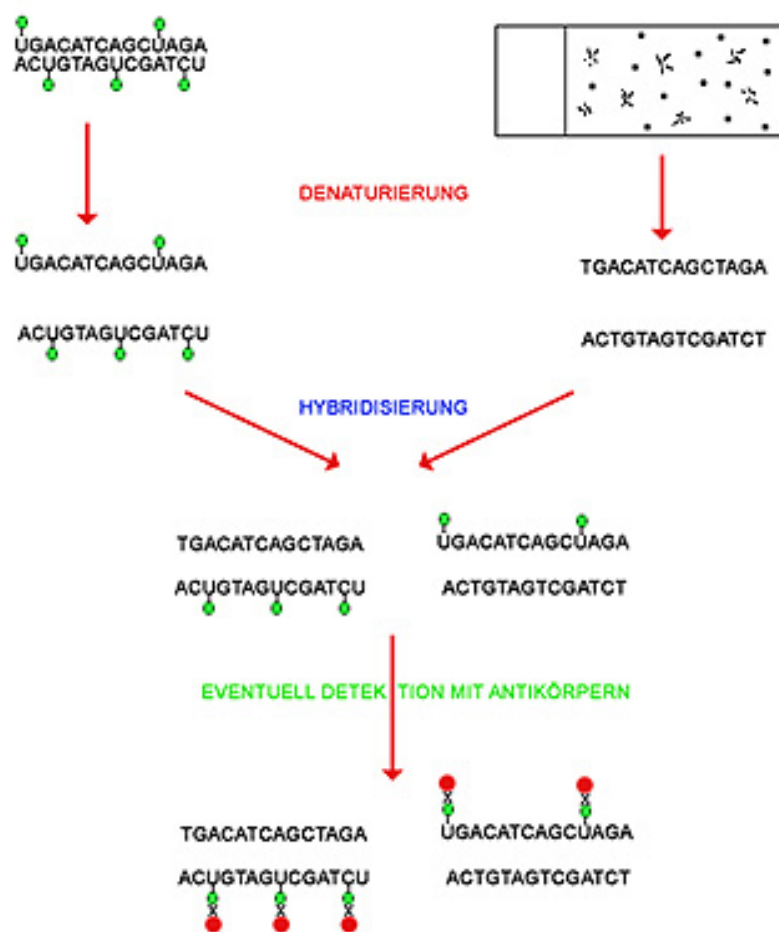
### 1.1.3 Molekulare Zytogenetik

Mit der in *situ* Hybridisierung kam ein weiteres entscheidendes Werkzeug zur Charakterisierung von genetischem Material hinzu. Diese molekularzytogenetische Methode ermöglicht den Nachweis von Nukleinsäuresequenzen in Interphasekernen, auf Metaphasen oder im Gewebe. Markierte Sonden-DNA und Ziel-DNA werden hierzu getrennt denaturiert und anschließend zusammen bei 37°C hybridisiert (s. Abb.1.1). Eine Übersicht über die Methode findet sich u.a. bei Rautenstrauß und Liehr (2002). Mögliche Anwendungsgebiete der FISH sind in Tab. 1.1 dargestellt.

Mit der radioaktiven in *situ* Hybridisierung (RISH) gelang es Pardue and Gall 1969 und unabhängig davon John et al. 1969 erstmals, DNA innerhalb des Zellkerns bzw. eines Gewebes sichtbar zu machen. Erstmals konnten hier DNA- Abschnitte von ca. 500 bp in *situ* nachgewiesen werden. Die Nachteile dieses Verfahrens mit radioaktiven Sonden sind v.a. die benötigten strengen Sicherheitsvorkehrungen, aber auch eine mehrwöchige Expositionszeit und ein geringes räumliches Auflösungsvermögen (Boehringer, Application Manual).

**Tab.1.1: Übersicht einiger möglicher Anwendungsgebiete der Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (modifiziert nach Leitch et al., 1994).**

1) Detektion von numerischen Aberrationen:	3) Detektion von Genveränderungen:
- Pränataldiagnostik (Amnionzellen, Chorionzellen, evtl. fetale Zellen aus dem mütterlichen Blut)	- Deletion
- Konzeptionsprodukte	- Fusion
- Postnatale Diagnostik	- Amplifikation von Onkogenen
- tumorzytogenetische Diagnostik	4) Abstammungsanalysen in neoplastischen Zellen
- Gewebsuntersuchungen	5) Verlaufskontrolle bei malignen Erkrankungen
2) Detektion von strukturellen Aberrationen:	6) Genexpressionsstudien
- Translokationen	7) Genkartierung
- Insertionen	8) Nachweis von Viren- DNA in den Zellen
- Mikrodeletionen	9) Genomorganisationsstudien
- Markerchromosomen	10) Zellzyklusanalysen



**Abb.1.1: Schematische Darstellung der Hybridisierung von markierter Sonden- DNA.**

Ein wichtiger Schritt für die Routinediagnostik war demzufolge die Einführung von nicht- radioaktiven Liganden, der Beginn der Fluoreszenz in *situ* Hybridisierung (FISH). Zwar war die Sensitivität zunächst geringer, dafür wurden differentielle Färbungen möglich, da sehr bald verschiedene Antikörper (Biotin, Digoxigenin, später Rhodamin, BrDU...) zum Einsatz kamen (Langer et al., 1981, Kessler et al., 1990).

Auch die Entwicklung verschiedener Techniken zur Markierung von DNA war von großer Bedeutung. Man unterscheidet die enzymatischen Methoden, zu denen die Nicktranslation (Rigby et al., 1977), das Random Priming (Feinberg and Vogelstein 1984) und die Markierung mittels DOP-PCR (Telenius et al., 1992) gehören und die chemische Markierung mit funktionellen Gruppen wie z.B. primären aliphatischen Aminen (Landegent et al., 1984) oder Schwefelhydroxidgruppen (Hopman et al., 1987).

Inzwischen stehen nicht nur Haptene (wie Biotin, Digoxigenin, BrDU,...) zur Verfügung, die anschließend mit antikörpergekoppelten Fluorochromen detektiert werden (ELISA- Prinzip), sondern auch fluoreszenzmarkierte dUTP (z.B. SpectrumGreen, TexasRed, AMCA...). Diese werden direkt in die DNA eingebaut und müssen nicht in einem zweiten, zeitaufwendigen Schritt mit Fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert werden. Eine Übersicht findet sich u.a. bei Rautenstrauß und Liehr (2002).

Mit Nederlof et al. begann 1989 die Vielfarb- FISH- Ära. Er beschrieb erstmals die simultane Detektion von bis zu sieben Sonden mit nur 3 verschiedenen Farbstoffen (sogenanntes kombinatorisches Markieren = ‚Combinatory Labelling‘).

Die logische Konsequenz war die Kombination von mehr als 3 Farbstoffen und so gelang es Speicher et al. 1996 die ‚multiplex- Fluorescence in *situ* hybridization‘- (M- FISH)- Technik zu entwickeln, bei der es möglich ist, alle 24 menschlichen Chromosomen durch Kombination von 5 verschiedenen Farbstoffen in nur einer Hybridisierung eindeutig nachzuweisen. Im gleichen Jahr etablierten Schröck et al. (1996) das Spectral Karyotyping (SKY), wobei sich die Protokolle nur in der Auswertungsprozedur unterscheiden. So wurde es möglich, komplexere Chromosomenaberrationen zu erfassen. Vor allem die oft qualitativ schlechten Tumorchromosomen wurden einer Diagnostik besser zugänglich.

1992 etablierten Nederlof et al. das „Ratio- Labelling“, bei dem verschiedene Verhältnisse von Fluoreszenzintensitäten kombiniert werden und so eine höhere Zahl

an Farbkombinationen ermöglichen. Eine Erweiterung erfolgte durch das Combined Binary RAtio Labelling (COBRA), bei dem das „Ratio- Labelling“ und das „Combinatory- Labelling“ verknüpft werden, wodurch bis zu 96 verschiedene Farbkombinationen unter Verwendung von nur 4 Farbstoffen möglich werden (Tanke et al., 1999). Jedoch weisen auch diese Verfahren Einschränkungen bei der Detektion v.a. von intrachromosomalen Aberrationen auf, so dass die Entwicklung von Vielfarbbänderungsverfahren (z.B. das Multicolorbanding = MCB) eine logische Folge war (Liehr et al., 2002c).

Jedoch ist es auch mit den oben genannten Verfahren häufig nicht möglich, kleine überzählige ‚Markerchromosomen‘ zu charakterisieren, woraus die Notwendigkeit einer neuen, einfacheren und zeitsparenderen Methode erwuchs.

## 1.2 Markerchromosomen

Ein „Markerchromosom“ ist ein strukturell abnormes Chromosom, bei dem kein Teil mittels konventioneller zytogenetischer Techniken eindeutig charakterisiert werden kann (Mitelman, 1995). Markerchromosomen können in ihrer Größe sehr variieren. So können sie größer als das normalerweise größte menschliche Chromosom 1 sein oder kleiner als der kurze Arm von Chromosom 17. In der vorliegenden Arbeit geht es fast ausschließlich um letztgenannte Markerchromosomen. Die Bezeichnung kleines/ überzähliges (abnormes) Chromosom (SMC = small supernumerary marker chromosome) wird in der Literatur nicht immer einheitlich verwendet. Früher wurden damit Chromosomen bezeichnet, die mit herkömmlichen Methoden nicht identifiziert werden konnten, manche Autoren rechneten aber auch solche Marker dazu, die z.B. als inv dup (15) klassifiziert werden konnten (Hook and Cross, 1987). Heute werden Chromosomen als Marker bezeichnet, die mittels GTG-, C-, oder NOR- Banding nicht eindeutig klassifiziert werden können. In manchen Arbeiten wird an Stelle von SMC auch der Begriff ESAC (= extra structurally abnormal chromosome) verwendet (Hook and Cross, 1987; Hastings et al., 1999; Rothlisberger et al., 2000; Kaluzewski et al., 2001). Mittels FISH identifizierte Marker werden anschließend als derivative Chromosomen (der) bezeichnet. In dieser Arbeit wurde der Begriff Marker bzw. SMC aus Gründen der Übersichtlichkeit auch für bereits charakterisierte Chromosomen beibehalten.

### 1.2.1 Bedeutung von Markerchromosomen

Kleine zusätzliche Markerchromosomen können zu ernsthaften Problemen bei der genetischen Beratung werden. Sie korrelieren häufig mit Unfruchtbarkeit, mentaler Retardierung und/ oder kongenitalen Missbildungen (Buckton et al., 1985, Warburton, 1991). Vor allem, wenn sie bereits in der Pränataldiagnostik gefunden werden, ist das Risiko einer phänotypischen Abweichung oft schwierig zu ermitteln. Aufgrund der Variabilität, der verschiedenartigen Herkunft der Markerchromosomen sowie der Möglichkeit des Imprintings bzw. einer Disomie der beiden homologen Chromosomen, von denen der Marker abstammt, ist die klinische Ausprägung sehr unterschiedlich (Crolla, 1998). Liegt das Markerchromosom familiär vor, wird das Risiko als gering angesehen, da angenommen werden kann, dass das Kind den gleichen, anscheinend normalen Phänotyp des Markertragenden Elternteils aufweist. Schwieriger wird es allerdings, wenn ein Elternteil ein Mosaik des Markers aufweist, während dieser beim Kind durchgehend vorhanden ist. Tritt der Marker *de novo* auf, wird das allgemeine Risiko für einen abnormen Phänotyp mit 13% angegeben, basierend auf einer Studie über 377`357 Amniozentesen, wobei 123 Markerchromosomen gefunden wurden (Warburton, 1991).

Die Inzidenz für Markerchromosomen (s. auch Tab.1.2) bei Neugeborenen beträgt 0,14- 0,72/ 1000 (Jacobs et al., 1974; Hamerton, 1975; Nielsen and Sillesen, 1975; Nielsen and Wohler, 1991), in der Pränataldiagnostik liegt sie bei 0,65- 1,5/ 1000 Feten (Ferguson- Smith and Yates, 1984; Warburton, 1984; Hook and Cross, 1987; Sachs et al., 1987). 0,4- 0,5/1000 sind *de novo* entstanden, während 0,3- 0,4/1000 familiär auftreten (Blennow et al., 1994; Warburton, 1991). Hierbei muss allerdings bedacht werden, dass die Daten für SMC im wesentlichen entweder aus Pränataluntersuchungen, wobei es strenge Indikationen (z.B. Alter der Mutter, Auffälligkeiten im Ultraschall) für die Durchführung einer solchen Analyse gibt, oder aus Untersuchungen postnatal klinisch auffälliger Patienten bzw. aus Infertilitätsstudien bei Erwachsenen stammen. Dies könnte auch einer der Gründe sein, warum die Inzidenz bei Neugeborenen etwas geringer ist als die pränatal gefundene. Auch ist es möglich, dass sehr kleine Marker oder Marker, die im Mosaik auftreten, der Diagnostik entgehen (Benn and Hsu, 1984).

Etwa 81% aller Marker sind akrozentrisch (Warburton, 1991), stammen also von den Chromosomen 13, 14, 15, 21 oder 22 ab. 62% aller Marker haben ihren Ursprung im Chromosom 15 (Blennow et al., 1994).

**Tab.1.2: Zusammenstellung verschiedener Untersuchungen zur Häufigkeit von Markerchromosomen prä- und postnatal.**

Referenz	unter- suchtes Material	untersuch- te Fälle insgesamt	Markerchromosomen pro 1000 Fälle		
			Familiär	De novo	insgesamt
<b>pränatal:</b>					
Ferguson- Smith and Yates (1984)	AZ	52 965	–	–	0,6
Warburton (1984)	AZ	76 952	0,25	0,4	0,65
Benn and Hsu (1984)	AZ	6 500	0,46	0,77	1,23
Hook and Cross (1987)	AZ	75 000	0,3- 0,4	0,4- 0,5	0,8
Sachs et al. (1987)	AZ	10 000	0,6	0,9	1,5
Warburton (1991)	AZ	377 357	-	-	0,43
Blennow et al. (1994)	AZ/CZ	39 105	0,3- 0,4	0,4- 0,5	0,8
	AZ	34 908	0,3- 0,4	0,4- 0,5	0,8
	CZ	4 197	-	0,5	0,5
Brøndum- Nielsen and, Mikkelsen (1995)		12 699	0,39	0,71	1,1
Li et al.(2000)	AZ	15781	0,32	0,82	1,14
<b>postnatal:</b>					
Jacobs et al. (1974)		11 680	-	-	0,2
Hamerton et al. (1975)		14 069	-	-	0,14
Nielsen and Sillesen (1975)		11 148	-	-	0,54
Nielsen and Wohler (1991)		34 919	-	-	0,72
Buckton et al. (1985)		16 395			0,24

**AZ: Amniozyten; CZ: Chorionzyten**

### 1.2.2 Morphologie von Markerchromosomen

Markerchromosomen (SMC) variieren in ihrer Größe und Morphologie stark. Sie sind oft kleiner oder nur geringfügig größer als Chromosomen der Gruppe G und enthalten oft große Mengen an konstitutiven Heterochromatin (Schmid et al., 1986). Die meisten Markerchromosomen enthalten  $\alpha$ - Satelliten- DNA, aber auch Chromosomen ohne  $\alpha$ - Satelliten- DNA mit voller mitotischer Funktion sind in der Literatur beschrieben worden (s. 1.2.2.4).

Häufig sind Marker dizentrisch und/ oder ringförmig. Akrozentrische SMC tragen häufig zwei Satelliten (= kurze Arme) und werden dann als ‚bisatellited marker‘ bezeichnet (Schmid et al., 1986; Crolla et al., 1995 und 1998).

### 1.2.2.1 Zentromere

SMC bestehen im Wesentlichen zumeist aus Zentromermaterial.

Ein Zentromer ist definiert als die zentrale primäre Einschnürung und Ansatzstelle der Spindelfasern am Chromosom (Pschyrembel, 257. Aufl.). Man unterscheidet im Zentromer eine Paarungsdomäne, eine zentrale Domäne und das Kinetochor (Earnshaw and Rattner, 1989). Während die Paarungsdomäne eine wichtige Rolle bei der Schwesterchromatidenpaarung und der Bindung von Zentromerproteinen spielt, beinhaltet die zentrale Domäne konstitutives Heterochromatin, das vorrangig aus  $\alpha$ -Satelliten-DNA (alphoider DNA) besteht. Das Kinetochor ist ein Proteinkomplex, der sich in der späten Prophase der Mitose bildet und eine Rolle bei der Formgebung des zentromerspezifischen Chromatins, bei der Bindung/ Lösung der Schwesterchromatiden, bei der Kontrolle des Zellzyklus und als Motor der Chromatidenbewegung spielt (Rieder and Salmon, 1998).

### 1.2.2.2 Zentromer- DNA

In den Zentromeren findet man große Mengen repetitiver DNA in einer Länge von mehreren 100 Kb bis zu 10 Mb pro Chromosom. Diese DNA wird auch als konstitutives Heterochromatin bezeichnet.

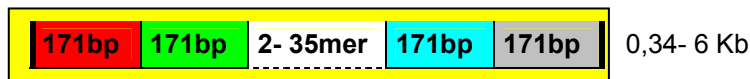
#### 1.2.2.2.1 $\alpha$ - Satelliten- DNA

$\alpha$ - Satelliten- DNA ist die häufigste Form repetitiver DNA in Zentromeren (3- 5% der gesamten chromosomalen DNA; Voullaire et al., 1993). Die Grundeinheit eines Zentromers besteht aus 2- 35 Monomeren von ca. 171bp, die tandemförmig in „head to tail- fashion“ angeordnet sind (Rosenberg, 1978; Wu and Manuelidis, 1980). Die Monomere unterscheiden sich untereinander mit einer Divergenz bis zu 35% (Choo, 1997).

Eine übergeordnete Einheit wiederum besteht aus multiplen Kopien dieser Grundeinheiten (s. Abb.1.2) und ist durch die Schnittstellen von Endonukleasen definiert (Choo, 1997).

**Abb. 1.2:** Darstellung einer Grundeinheit, bestehend aus 2-35 Monomeren sowie einer übergeordneten Einheit bestehend aus multiplen Kopien dieser Grundeinheit.

**Grundeinheit:**



**übergeordnete Einheit :**



Es gibt 3 verschiedene Muster für die Lokalisation übergeordneter  $\alpha$ - Satelliten-Einheiten (s. auch Tab.2.1):

- ◆ nur auf einem spezifischen Chromosom vorkommend (z.B. D3Z1, D6Z1...)
- ◆ auf zwei oder mehr Chromosomen vorkommend (z.B. D13Z1 auf den Chromosomen 13 und 21, D14/22Z1 auf den Chromosomen 14 und 22, D1Z5 auf den Chromosomen 1, 5 und 19...)
- ◆ auf einem Chromosom sind beide Formen vertreten (z.B. Chromosom 1: D1Z5= spezifisch für die Chromosomen 1/5/19 und D1Z7= spezifisch für das Chromosom 1)

#### 1.2.2.2 Klassische Satelliten- DNA

Die erste identifizierte zentromerische DNA wurde aus den 3 Fraktionen, die im  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$ - Gradienten entstehen, isoliert (Corneo et al., 1967). Sie wurde als klassische Satelliten- DNA I- III bezeichnet und besteht aus kurzen, AT- reichen sich wiederholenden Sequenzen. Während man Satellit- I- DNA in der perizentrischen Region der Chromosomen 3 und 4 und den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen findet (Meyne, 1994), ist Satellit- II- DNA vor allem in der Heterochromatinregion von Chromosom 1 (1qh) lokalisiert (Cooke and Hindley, 1979). Satellit- III- DNA findet sich in den Heterochromatinregionen von Chromosom 1, 9 und 16, dem langen Arm des Chromosom Y sowie den kurzen Armen aller akrozentrischen Chromosomen (Moyzis et al., 1987).



### **1.2.2.2.3 $\beta$ - Satelliten DNA**

$\beta$ - Satelliten- DNA wurde ursprünglich durch Meneveri et al. (1985) identifiziert und erst später durch Waye und Willard (1989) als solche bezeichnet. Sie besteht aus G- C- reichen Monomeren von 68bp, die in bis zu mehreren hundert Kilobasen hintereinandergeschaltet sind (Lee et al., 1997).  $\beta$ - Satelliten DNA findet man in den Chromosomen 1 und 3, den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22) und im Heterochromatinbereich der Chromosom 9 und Y.

### **1.2.2.3 Heteromorphismus des zentromerischen Heterochromatins**

Die Anzahl der Kopien übergeordneter Einheiten in den Zentromeren kann beträchtlich variieren (Yurov et al., 1987). So kann die Kopienzahl ein Mehrfaches eines normalen Zentromers betragen oder aber mit Hilfe der FISH- Technik überhaupt nicht mehr nachweisbar sein. Zum Beispiel variiert der Bereich von Zentromer X zwischen 1380 und 3730 Kb (Mahtani and Willard, 1990) oder von Zentromer 21 zwischen 420 und >2650 Kb (Marcais et al., 1991; Trowel et al., 1993). Extreme Reduktion der  $\alpha$ - Satelliten- DNA ist beim Menschen sehr selten (0,12-0,11% für die Chromosomen 13 und 17, 0% für die restlichen), mit Ausnahme des Zentromer 21 (3,7%) (Lo et al., 1999) und kann dann zu Fehlinterpretationen in der Auswertung der FISH- Signale führen (Mizunoe and Young, 1992; Weier and Gray, 1992; Bossuyt et al., 1995). Eine klinische Relevanz der Heteromorphismen ist bislang nicht beschrieben.

### **1.2.2.4 Marker ohne alphanoid DNA**

Das Zentromer spielt eine entscheidende Rolle bei der korrekten Erkennung und Trennung der Schwesterchromatiden in der Zellteilung (z.B. van Hooser et al., 1999).

Ein Chromosom, das kein funktionsfähiges Zentromer besitzt, geht bei der nächsten mitotischen Teilung verloren, was häufig den Zelltod zur Folge hat (Wandall et al., 1998).

Bisher ist unklar, welche Rolle  $\alpha$ - Satelliten- DNA bei der Funktion des Zentromers spielt, da auch funktionsfähige Zentromere ohne  $\alpha$ - Satelliten- DNA in der Literatur beschrieben wurden (z.B. Verma and Luke, 1992; Voullaire et al., 1993; Vance et

al., 1997; Wandall et al., 1998; Magnani et al., 1998; Barry et al., 1999; Mackie-Ogilvie et al., 1993; d., 2001). So lange  $\alpha$ - Satelliten- DNA vorhanden ist, scheint sich das Zentromer dort zu bilden. Bei dessen Abwesenheit können andere DNA-Sequenzen (durch Änderung der Chromatinstruktur) Zentromerfunktionen übernehmen (Wandall et al., 1998). Solche „Ersatzsequenzen“ wurden unter anderem in den Regionen 10q25 (Voullaire et al u Sart et al., 1997; Barry et al., 1999), 8p23 (Ohashi et al., 1994), 15q23 (Blennow et al., 1994), 3p23 (Marashio et al., 1996), 3q26 (Wandall et al., 1998), 13q32 (Rivera et al., 1999) und im Yq- Heterochromatin (Bukvic 1996) gefunden.

### 1.3 Fragestellung

Bis zur Einführung der FISH- Technik konnten Markerchromosomen nur durch Bänderungsmethoden und Variationen in der Menge des Euchromatins zytogenetisch charakterisiert werden. Eine Charakterisierung war jedoch in der Regel unmöglich.

Obwohl es schon seit 1996 die Möglichkeit gibt, alle Chromosomen gleichzeitig zu charakterisieren (M- FISH), mussten Zentromere bisher in mehreren Schritten erfasst werden (Rauch et al., 1992; Plattner et al., 1993a, Starke et al., 1999 ; Li et al., 2000). Dies war insbesondere bei kleinen Markerchromosomen, die weder mit Hilfe der konventionellen Zytogenetik, noch mit der M- FISH-/ SKY- Technik identifiziert werden konnten, da zu wenig euchromatisches Material auf ihm vorhanden war, notwendig (Haddad et al., 1998, Uhrig et al., 1999, Langer et al., 2001). Für das Abschätzen des Risikos einer phänotypischen Veränderung beim Patienten ist es aber von großer Bedeutung, die Herkunft des Markerchromosoms zu kennen. Neben der obengenannten Möglichkeit einer sukzessiven Hybridisierung aller menschlichen Chromosomen gab es bisher nur noch eine weitere Möglichkeit, SMC zu charakterisieren: die Mikrosezierung mit Amplifizierung der Fragmente und anschließender FISH auf normale Metaphasen (Viersbach et al., 1994; Starke et al., 2001).

Aufgrund des häufig limitierten Zellmaterials, sowie Zeit- und Kostengründen, war es trotz der zur Verfügung stehenden Methoden bis vor kurzem in vielen Labors nicht möglich, alle Markerchromosomen zu identifizieren (Gravholt and Friedrich, 1995). Die Idee dieser Arbeit war, ein einfaches und schnelles Verfahren zur Cha-

Charakterisierung von SMC zu etablieren: eine Multicolor- Zentromer- FISH- Methode (cenM- FISH) in Anlehnung an das Multicolor- Verfahren für Ganzchromosomen (M-FISH).

Da ca. 81% aller Markerchromosomen akrozentrisch sind (Warburton, 1991) und häufig schon in der Giemsa- Färbung identifiziert werden können, bot es sich an, einen Ansatz (AcroCenM- FISH) zur einfacheren Charakterisierung dieser vorselektionierbaren Marker zusammenzustellen.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautet also:

- 1. Kann ein auf einer Hybridisierung basierender, verlässlich funktionierender cenM-FISH- bzw. AcroCenM-FISH- Mix etabliert werden, welcher**
- 2. sich in der Diagnostik an Fällen mit SMC bewährt?**

## 2 Material

### 2.1 Verwendete Sonden

Die in dieser Arbeit verwendeten Zentromersonden (s. Tab.2.1) wurden uns freundlicherweise von Dr. Mariano Rocchi, Bari, Italien zur Verfügung gestellt.

Tab.2.1: Übersicht über die, in dieser Arbeit verwendeten Zentromersonde.

chrom.	probe	vector	insert	release
2	pBS4D	bluescribe	1.3kb	EcoRI+Sall
3	pAE0.68	bluescribe	0.68kb	EcoRI
4	p4n1/4	bluescript	0.680kb	XbaI
4+9	pZ4.1	bluescribe	1.2kb	PstI
5+1+19	pZ5.1	pUC13	390+380bp	EcoRI+Sall
6	pEDZ6	bluescript	0.340	EcoRI
7	pZ7.5	pUC13	0.68kb	EcoRI
8	pZ8.4	bluescribe	1.2kb	PstI
9	pMR9A	bluescribe	0.34kb	EcoRI+Sall
10	pZ101.3	b.script	2.7kb	NotI+Sall
11	pRB11	bluescribe	0.68kb	EcoRI+Sall
12	pBR12	bluescribe	0.68kb	HindIII
14+22	p14.1	pUC13	1.36Kb	EcoRI+Sall
15	pMC15	bluescript	3.5kb	AccI+1site (Eco-Xho)
16	pZ16A	pUC13	0.68kb	EcoRI
17	pZ17-14	pUC19	1.020kb	HindIII
18	2Xba	pUC18	1.7kb	XbaI
20	pZ20	bluescribe	1.36kb	XbaI
21+13	pZ21A	bluescribe	0.85kb	EcoRI
22	pI90.22	bluescribe	2.0kb	PstI
X	pDMX1	bluescript	2.0kb	PstI
Y	pLAY5.5	bluescript	5.5kb	HindIII

chrom.= Chromosom; probe= Sonde; vector= Plasmidvektor; insert= Insert;  
release= Schnittstelle

Da für uns die Zentromer- spezifische Sonde D1Z5 nicht erhältlich war, wurde die Sonde D1Z1, welche den Heterochromatinbereich (1qh) abdeckt, verwendet. Sie wurde bei ATCC (American Type Culter Collection) käuflich erworben.

Zur Unterscheidung der Zentromere 5 und 6 wurde zusätzlich zu den oben aufgelisteten Sonden eine Mikrosezierungssonde (Midi12) des Instituts für Humangenetik, Jena eingesetzt, die Bereiche beider Zentromere abdeckt und in geringerer Intensität zusätzlich im Zentromerbereich der Chromsomen 1 und 19 bindet.

Des Weiteren kam eine, die Nucleolus-organisierende Region abdeckende Sonde (NOR-Sonde) zum Einsatz. Diese Sonde mit der Bezeichnung dJ1174A5 sowie die eingesetzte Sonde plaY 113.5 wurde uns ebenfalls durch Dr. Mariano Rocchi, Bari, Italien zur Verfügung gestellt. Letztere bindet im Bereich q12 des Y-Chromosoms.

Eine weitere verwendete Sonde aus dem Institut für Humangenetik Jena ist die Mikrosezierungssonde MIDI 54, die die kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen abdeckt.

## **2.2 Fälle mit kleinen Markerchromosomen**

Fünf Fälle aus der Pränatal-, ein Fall aus der Postnatalzytogenetik, zwei Fälle aus der Tumorzytogenetik sowie zwei Zelllinien wurden untersucht.

### **2.2.1 Pränatal**

#### **Fall Nr.1:**

Im ersten Fall handelt es sich um Fruchtwasser einer 35-jährigen Frau nach intrazytoplasmatischer Spermieninjektion (ICSI). Die Amniozentese wurde in der 15. SSW durchgeführt. Die konventionelle GTG-Bänderungsanalyse ergab folgenden Karyotyp: **47,XX,+mar[16]/46,XX[7]**.

Mittels einer im Anschluß durchgeführten M-FISH-Hybridisierung konnte der kleine Marker nicht identifiziert werden. Dies spricht für geringe oder gar nicht vorhandene Mengen an euchromatischem Material. In der Ultraschallfeindiagnostik konnten eine geringgradige beidseitige Pyeloektasie und ein echogener Darm diagnostiziert werden. Nach der Geburt (Geburtsgewicht 2850g) wurde ein einseitig leicht erweiterter Ureter festgestellt, weitere Auffälligkeiten bestanden nicht. Auch 2 Jahre nach der Geburt wies das Kind keine Entwicklungsauffälligkeiten auf (publiziert durch Starke et al., 1999).

**Fall Nr.2:**

Im vorliegenden Fall handelt es sich um das Fruchtwasser einer Frau mit habitueller Abortneigung und Zustand nach Gravidität mit Robertson'scher Translokation (Karyotyp: **46,XX,-21,+t(21;21)(q10q10)**) im Vorjahr. Mittels GTG-Bänderung fand sich in allen Metaphasen ein SMC, das sich nach C-Bänderung und NOR-Färbung als monozentrisches und an beiden p-Armen satellitentragendes Chromosom erwies.

Karyotyp nach Zytogenetik: **47,XX,+der(21;21)(q10;q10)**

**Fall Nr.3:**

In der Amnionzellsuspension wurde mittels konventioneller Zytogenetik ein Markerchromosom in ca. 40% der Zellen gefunden, welches nicht identifiziert werden konnte. Grund für eine Amniozentese war die Altersindikation, die Schwangerschaft verlief bis zu diesem Zeitpunkt unauffällig.

Karyotyp nach Zytogenetik: **47,XY,+mar[43]/46,XY[7]**

**Fall Nr.4:**

Auch in diesem Fall konnte ein in 50% der Amnionzellen gefundenes Markerchromosom mittels konventioneller Zytogenetik nicht identifiziert werden. Anhand von Spezialfärbungen (NOR-, CBG-Färbung) konnte lediglich festgestellt werden, dass es sich wahrscheinlich um einen ‚bisatellited marker‘ handelt. Die Amniozentese erfolgte aufgrund eines im Ultraschall gefundenen ‚white spot‘ im linken Ventrikel und der Altersindikation.

Karyotyp nach Zytogenetik: **47,XY,+mar[5]/46,XY[5]**

**Fall Nr.5:**

Die Amniozentese erfolgte aufgrund einer habituellen Abortneigung.

Karyotyp nach Zytogenetik: **48,XX,+mar[16]/46,XX[4].**

### 2.2.2 Postnatal

#### Fall Nr.6:

In diesem Fall handelt es sich um ein zur Zeit der Untersuchung 20 Monate altes Kind mit Zustand nach Vorhofseptumdefekt, cerebralen Krampfanfällen, Retinablutung (mit V.a. Grubenpapille), psychomotorischer und körperlicher Retardierung, Dysmorphiesyndrom, Nierendysplasie und obstruktiver Bronchitis.

Auch hier konnte der vorhandene Marker mittels konventioneller Zytogenetik nicht identifiziert werden.

Karyotyp nach Zytogenetik: **47,XX,+mar**

### 2.2.3 Tumor

#### Fall Nr.7:

Aufgrund des Verdachts auf ein myeloproliferatives Syndrom wurde das Knochenmark eines 48-jährigen Patienten zytogenetisch untersucht. Hierbei fand sich ein kleines Markerchromosom in 18 von 20 untersuchten Metaphaseplatten, welches nicht identifiziert werden konnte. Es zeigte sich eine leichte CGB-, aber keine NOR-positive Färbung auf dem Marker. Das Vorhandensein des Markers in Blutlymphozyten konnte ausgeschlossen werden, so dass es sich sehr wahrscheinlich um einen erworbenen Marker handeln musste. Mittels Mikrosezierung und anschließendem „reverse painting“ (Senger et al. , 1997) wurde folgender Karyotyp erstellt: **[rev ish der(11)(p?11.2;11q11)(11)(q14)]**.

Histopathologische Untersuchungen des Knochenmarks führten zur Diagnose einer atypischen Philadelphia- negativen CML ohne Blastenschub oder stärkerer Knochenmarksfibrose. (Publiziert durch Starke et al., 2001)

### 2.2.4 Fälle mit HSR-Markern

#### Fall Nr.8:

Bei diesem Fall handelt es sich um einen Marker, der im Knochenmark eines Patienten mit hochmalignem Non- Hodgkin- Lymphom gefunden wurde. Auch hier konnte mittels konventioneller Zytogenetik keine Aussage über die Herkunft des Markers gemacht werden. Im DAPI-Banding konnte lediglich festgestellt werden, dass es sich um ein mehrere Zentromere tragendes Chromosom handelt.

**Fall Nr.9:** (Osteosarkom-Zelllinie RH 30; beschrieben in Oliner et al., 1992)

Im Vorfeld durchgeführte Arbeiten an Chromosomen dieser Zelllinie zeigten bereits eine Amplifikation der Zentromer-17-spezifischen Alphasatelliten-DNA. Diese war kombiniert mit einer Amplifikation des PMP22-Gen, einem Onkogen, das auf Chromosom 17 lokalisiert ist (Liehr et al., 1997). Dieses zytogenetisch sichtbare Äquivalent der Genamplifikation bezeichnet man als *homogeneously staining region (HSR)*.

**Fall Nr.10:** (Osteosarkom-Zelllinie SA 1; beschrieben in Oliner et al., 1992)

Auch hier wurde bereits im Vorfeld ein HSR- Marker mit Zentromer-12- und Onkogenamplifikation nachgewiesen (unpublizierte Daten).



## 2.3 Verwendete Reagenzien, Lösungen, Puffer und Medien

### 2.3.1 Reagenzien für die Kultivierung von Lymphozyten

Firmenname	Firma	Konzentration
<b>Colcemid</b>	Seromed	Stammlösung mit 10µg/ml
<b>Nährmedium</b>	Gibco BRL	PRMI 1640 mit Glutamax- Zusatz: L-Alanin und L-Glutamin
	BiochromKG	Fetales Kälberserum 12%
	BiochromKG	Penizillin (100 000 U/ml)
	BiochromKG	Streptomycin (10 000 U/ml) 1%
<b>KCl</b>	Merk	0,56% in Aqua dest.
<b>Phythämagglutinin (PHA)</b>	Seromed	Lyophilisiertes PHA in 5 ml Aqua ad iniectionabilia (Braun) lösen, bei – 20°C lagern
<b>Eisessig</b>	Roth	100%
<b>Methanol</b>	Merk	

### 2.3.2 Reagenzien für die PCR

Firmenname	Firma	Konzentration
<b>GeneAmp 10xPuffer II</b>	Perkin Elmer	1,5ml:100mM Tris- HCl, pH 8,3 (25°C); 500mM KCl
<b>MgCl<sub>2</sub> Solution</b>	Perkin Elmer	1,5ml:25mM MgCl <sub>2</sub>
<b>AmpliTaQ DNA Polymerase</b>	Perkin Elmer	1000 Units, 5U/µl
<b>AmpliTaQ DNA Polymerase, Stoffel Fragment</b>	Perkin Elmer	1000 Units 10 Units/µl
<b>T7 Sequenase version 2.0 DNA</b>	Amersham	200 Units 13U/µl
<b>Reaction Buffer</b>	Perkin Elmer	5xconcentrate: 200mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM MgCl <sub>2</sub> , 250mM NaCl
<b>Sequenase dilution buffer</b>	United State Biochemical	50mM Tris-HCl, pH 7,5, 10mM 2- mercaptoethanol
<b>GeneAmp dNTPs</b>	Perkin Elmer	10mM
<b>DOP-Primer</b>	IMB Jena	10µM

### 2.3.3 Reagenzien für die Quantifizierung, Fragmentlängenbestimmung und den Dnase-Verdau

Firmenname	Firma	Konzentration
Ethidiumbromid	Serva	
Agarose (SEA KEM LE)	FMC Bioproducts	
DNase I	Roche	20 000 U

### 2.3.4 Reagenzien für die Nicktranslation

Firmenname	Firma	Konzentration
Sephadex G-50 DNA Grade	Pharma Biotech	100g
Biotin-Nick-Translations Mix	Boehringer Mannheim	160µl
Digoxigenin-Nick-Translations Mix	Boehringer Mannheim	160µl

Zusammensetzung des Kit: 5x konzentrierter Reaktionspuffer in 50% Glycerin, DNA Polymerase I, DNase I, 0,25 mM dATP, 0,25 mM dCTP, 0,25 mM dGTP, 0,17 mM dTTP, 0,08 mM Biotin-16-dUTP bzw. DIG-11-dUTP. Durch das molare Verhältnis von Biotin-16-dUTP zu dTTP ist ca. jedes 20.-25. Nukleotid mit Biotin/ DIG gekoppelt.

### 2.3.5 Verwendete dUTP und Antikörper

Firmenname	Abkürzung	Firma	Konzentration	Methode	Absorption (max.) in nm	Emission (max.) in nm
Diethylamino-Cumarin-5-dUTP	DEAC	NEN Life Science Products, Inc.	1 mM	direkt	353	461
Rhodamin 110 [R110]dUTP	R110	PE Applied Biosystems	0,1 mM	direkt	502	530
SpectrumGreen-dUTP	SG	Vysis	1 mM	direkt	497	524
SpectrumOrange-dUTP	SO	Vysis	1 mM	direkt	559	588
SpectrumRed-dUTP	SR	Vysis	1 mM	direkt	595	615
TexasRed-12-dUTP	TR	Molecular Probes	1 mM	direkt	587	612
Cyanin 5	Cy5	Amersham		indirekt	649	670
Cyanin 5.5 Mab Labelling Kit	Cy5.5	Amersham		indirekt	675	694
Avidin- Fluorescein-5-iso-thiocyanat	FITC	Vector Laboratories		indirekt	494	518
Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-	BIO	Boehringer Mannheim	1 mM	indirekt		

triphosphat (Bio-tin-16-dUTP)				
Digoxigenin-11-dUTP	DIG	Boehringer Mannheim	1 mM	indirekt
Biotinyliertes Antiavidin	BioAA	Vector Laboratories		indirekt
Anti-Mouse Ig-Digoxigenin		Boehringer Mannheim		indirekt
Anti-Digoxigenin (in mouse)	$\alpha$ -dig	Boehringer Mannheim		indirekt

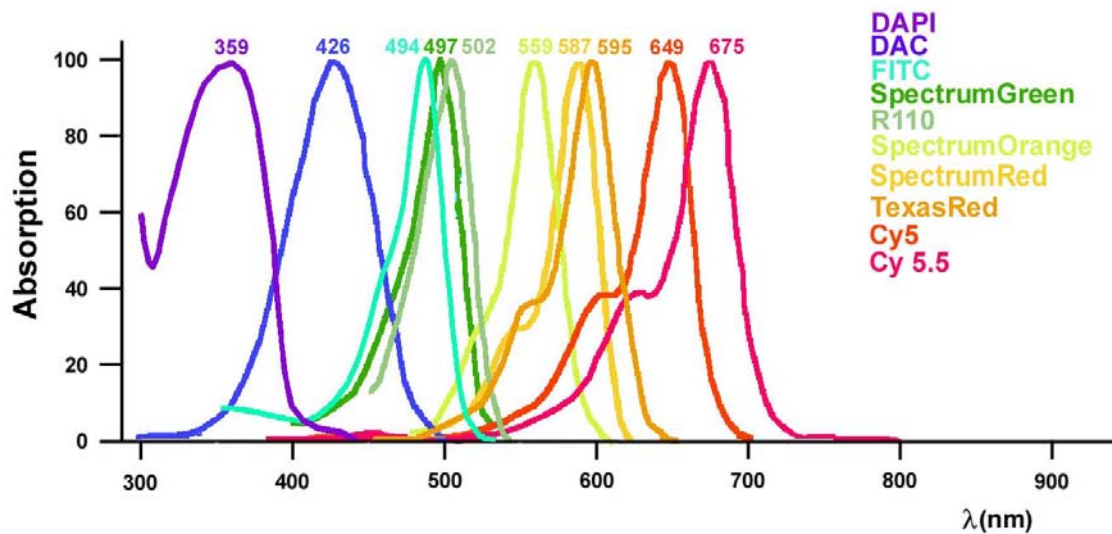


Abb.2.1: Graphische Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore. Die Auflistung der Fluorophorabkürzungen von oben nach unten entspricht der Spektrenreihenfolge von links nach rechts. Die Wendepunkte der Spektren sind mit der Wellenlänge gekennzeichnet, bei der die maximale Energieabsorption spezifisch für das jeweilige Fluorophor erreicht wird. (Die Abbildung wurde mir freundlicher Weise von Fr. Lemke, Institut für Anatomie Jena, zur Verfügung gestellt.)

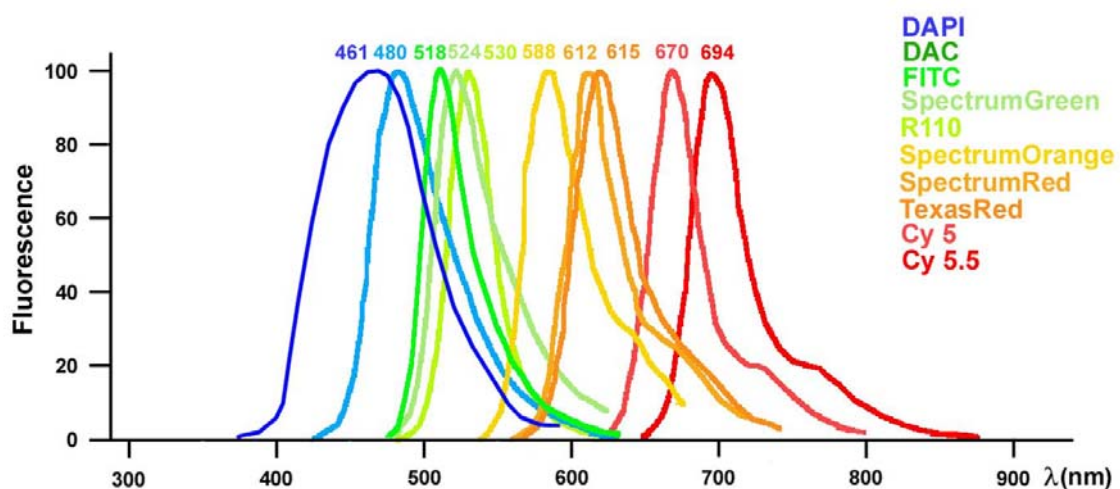


Abb.2.2: Graphische Darstellung der Emissionsspektren aller in dieser Arbeit verwendeten Fluorophore. Die Auflistung der Fluorophorabkürzungen von oben nach unten entspricht der Spektrenreihenfolge von links nach rechts. Die Wendepunkte der Spektren sind mit der Wellenlänge gekennzeichnet, bei der die größte Intensität der Emission spezifisch für das jeweilige Fluorophor erreicht wird. (Die Abbildung wurde mir freundlicher Weise von Fr. Lemke, Institut für Anatomie Jena, zur Verfügung gestellt.)

### 2.3.6 Reagenzien für die FISH

Firmenname	Firma	Konzentration/ Beschreibung
<b>20x SSC</b>	GibcoBRL	
<b>Formalin</b>	Roth	37% Formaldehyd ;p.a.ACS 1Liter
<b>Formamid (deionisiert)</b>	Sigma	
<b>HCl</b>	Merk	37% 1 mol/l Salzsäure
<b>Human COT-1-DNA</b>	GibcoBRL	500µg, 1mg/ml in 10mM Tris-HCl (pH7,4), 1mM EDTA
<b>Marvel</b>		zu 99% fettfreies Milchpulver
<b>Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline = PBS)</b>	Seromed (Biochrom KG)	9,55 g ad 1000ml Aqua bidest
<b>Vectashield® Mounting Medium</b>	Camon Vector Laboratories	
<b>Paraformaldehyd</b>		2g ad 100ml PBS
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Perkin Elmer	1,5ml:25mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Pepsin</b>	Sigma	2500 units/mg Substanz 3100 units/mg Protein
<b>tRNA</b>	Boehringer Mannheim	100mg ad 10ml Aqua bidest E.coli (10µg/µl)
<b>Fixogum</b>	Rupper Cement	elastischer Kleber zum Abdichten der Hybridisierungsfelder
<b>Phosphatpuffer</b>		0,89 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 10 ml H <sub>2</sub> O lösen (=0,5 M) 0,69 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 10 ml H <sub>2</sub> O lösen (=0,5 M)
<b>Aqua ad iniectabilia</b>	Braun	
<b>Aqua dest.</b>		Mit Seralpur Delta (Seral®) hergestelltes Reinstwasser (deionisiert, organisch rein, partikelfrei), zusätzlich autoklaviert

### 2.3.7 Puffer, Lösungen, Medien und Sonstiges

Lösung	Zusammensetzung	Beschreibung
<b>0,4x SSC</b>	480 ml H <sub>2</sub> O 20 ml 20x SSC pH 7,0	Posthybridisierungswaschen bei 70°C (Rapidwash)
<b>2x SSC</b>	50 ml 20x SSC 450 ml H <sub>2</sub> O pH 7,0	Posthybridisierungswaschen bei 42°C
<b>4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI-Lösung)</b>	4 µl DAPI Stocklösung (50 mg/ml) 1 ml Vectashield® Mounting Medium Lagerung bei 4°C	Gegenfärbung der Chromosomen/ Minimierung des Ausbleichens der Fluorophore
<b>4x SSC/TW</b>	100 ml 20x SSC 400 ml H <sub>2</sub> O 250 µl 0,05 % Tween20 (Sigma) pH 7,0	Posthybridisierungswaschen
<b>50 % Formamid (FA) / 2x SSC</b>	250 ml Formamid 50 ml 20x SSC 200 ml H <sub>2</sub> O pH 7,0	Posthybridisierungswaschen bei 42°C

<b>70% Formamid/SSC (Denaturierungsmix)</b>	350 ml Formamid 50 ml 20x SSC 100 ml H <sub>2</sub> O	Denaturierung der Objektträger bei 72°C
<b>Fixativ</b>	75 % Methanol 25 % Essigsäure (immer frisch ansetzen oder bei -20°C lagern!)	Fixierung der Chromosomen nach der Kultivierung
<b>Hybridisierungsmix (Dextransulfat)</b>	2 g Dextransulfat (Sigma) 2 ml 20x SSC 2 ml 0,5 M Natriumphosphat 5 ml deionisiertes Formamid ad 10 ml mit H <sub>2</sub> O (DNA wird darin gelöst) (bei 70°C (3 h) lösen)	Denaturierung und Hybridisierung der Sonden-DNA
<b>Marvel/SSC/TW</b>	0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4x SSC/TW lösen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugieren, obere Schicht werfen	Zum Lösen der Antikörper bei der Detektion
<b>Natriumacetat-Lösung 3M (bezogen auf Acetat)</b>	24,6 g wasserfreies Natriumacetat (Sigma) in 100 ml H <sub>2</sub> O lösen und auf pH 4,8 - 5,2 mit Essigsäure einstellen	Zusatz beim Fällern der DNA
<b>Postfixierungslösung (für Pepsinverdau)</b>	2,5 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> (50 mM) 22,5 ml 1x PBS 25 ml Paraformaldehyd	Fixierung der Chromosomen nach dem Pepsinverdau
<b>Stop-Mix</b>	0,25% Bromphenolblau 0,25% Dextranblau 0,50M EDTA	Stoppen der Reaktion nach der Nicktranslation
<b>Pepsinlösung</b>	5ml 0,2M HCl 95ml H <sub>2</sub> O 500µl Pepsin pH 2,0	Vorbehandlung der Objektträger vor der Hybridisierung (Verdau von Plasmaproteinen)

## **3 Methoden**

### **3.1 Herstellung zytogenetischer Präparate**

#### **3.1.1 Zellkultur**

##### **3.1.1.1 Lymphozytenkultur**

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Kultivierung von Lymphozyten nach Standardprotokoll (Verma and Babu, 1994).

Man verwendet als Ausgangsmaterial heparinisiertes Vollblut. Sterile Gewebekulturflaschen mit einem Volumen von 50 ml werden mit 10 ml Nährmedium, 0,1 ml Phytohaemagglutinin PHA- L und 1ml Blut gefüllt und über 72h bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>- Partialdruck von 5% inkubiert. Phytohaemagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein, das die T- Zell- Fraktion der Lymphozyten durch Bindung an die Zellmembran stimuliert, während die B- Zell- Fraktion und andere kernhaltige Zellen unbeeinflusst bleiben (Verma and Babu, 1994).

##### **3.1.1.2 Kultivierung von Amniozyten bzw. Zelllinien**

Die Kultivierung von Amniozyten oder Zelllinien erfolgte bereits in den Labors, die uns die Fälle mit SMC zusendeten (s. Danksagung).

#### **3.1.2 Präparation von Chromosomen**

##### **3.1.2.1 Colcemid- Behandlung**

Nach 72h Kultivierung der Lymphozyten aus (3.1.1) erfolgt die Behandlung mit Colcemid, dem synthetischen Derivat von Colchizin (Levan, 1938; Ronne, 1990), einem Alkaloid der Herbstzeitlose. Dieses verbindet sich nach dem Eintritt in die Zelle mit dem Mikrotubulussystem und bewirkt die Disaggregation der Tubulinuntereinheiten (Buddecke, 1989). Die Zellteilung wird somit in der Metaphase gestoppt und man erhält eine Anreicherung von Mitosen in diesem Stadium.

Pro Kulturflasche gibt man am Ende der Kultivierung 1 µg Colcemid zu und inkubiert bei 37°C für 1,5 h.

### 3.1.2.2 Präparation von Metaphasechromosomen

Zur Präparation der Chromosomen löst man die sedimentierten Zellen vorsichtig vom Boden der Kulturflasche und überführt sie in ein 15ml Falcon- Röhrchen. Anschließend wird 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt. Die Zugabe von 10ml hypotoner Lösung (0,599 g KCl/ 100 ml sterilem Aqua Bidest) und eine 20- minütige Inkubation bei 37°C bewirken die Lyse der Erythrozyten (Hsu, 1952). Zum Anfixieren gibt man vor dem erneuten Zentrifugieren 1 ml Fixativ (Eisessig: Methanol = 1:3, 4°C) zu. Methanol denaturiert und präzipitiert Proteine durch Dehydratation in saurer Umgebung, während die Essigsäure Nukleoproteine koaguliert und in Verbindung mit Wasser aus der Luft zu einer Zellschwellung bzw. einer „Chromosomendehnung“ führt (Ronne, 1990, Hliscs et al., 1997). Um die Suspension von den Erythrozyten und den Plasmaresten weitgehend zu säubern, erfolgt ein dreimaliges Waschen nach folgendem Schema:

- |                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• Überstand abnehmen</li><li>• 10 ml Fixativ hinzugeben, Zellen gut resuspendieren</li><li>• Zentrifugation 5 min bei 1500 U/min</li></ul> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Nach dem Waschen werden die Zellen, je nach Ausbeute, in ca. 1 ml Fixativ resuspendiert.

Vor dem Auftropfen auf den Objektträger (OT), sollte die Suspension für mindestens 45 min auf Eis gestellt werden. Man kann sie so über Jahre bei –20°C lagern.

### 3.1.2.3 Auftropfen der Suspension auf den Objektträger

Vor dem Auftropfen werden die OT (Menzel- Superfrost) entweder mit Seidenpapier gereinigt oder über Nacht in Prilwasser gestellt und bis zur Verwendung in einem Methanol- Salzsäure- Gemisch [35% Methanol, 1% HCl (32%), 64% Aqua Bidest] gelagert. Saubere OT sind eine wichtige Voraussetzung für die optimale Spreitung der Mitosen. Die OT werden vor dem Auftropfen in 4°C kaltes Wasser gestellt. Da die optimale Spreitung im wesentlichen von der Luftfeuchtigkeit und der Temperatur abhängig ist (Spurbeck et al., 1996; Hliscs et al., 1997), ist es

wichtig, diese beiden Faktoren möglichst konstant zu halten (als optimal und praktikabel gelten eine ca. 50%ige Luftfeuchtigkeit und eine Temperatur von 20°C).

Vorgehensweise:

Der OT wird in eine feuchte Kammer gelegt und die Suspension wird mit Hilfe einer Pipette aufgetropft. Sind die Mitosen sehr plasmahaltig, kann nach ca. 20 Sekunden mit Fixativ nachgetropft und somit der Verdunstungsvorgang verlängert werden. Anschließend wird der OT bei 50°C getrocknet. Das Verdunsten des Fixativs bewirkt die Fixierung der Zellen bzw. Metaphasen auf dem OT und gleichzeitig eine Spreitung und Dehnung der Chromosomen (Hliscs et al., 1997).

Neben Mitosen findet man auf dem OT zahlreiche Interphasekerne.

Je nach gewünschter Anzahl der Mitosen kann die Suspension verdünnt (Zugabe von Fixativ) oder verdichtet werden (Zentrifugation, Abnahme von Fixativ).

Nach Lufttrocknung der OT erfolgt die Dehydratation durch die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 90%, 100%).

Für die FISH- Prozedur sollten die OT „gealtert“ sein. Dazu lässt man sie am besten einige Tage bei Raumtemperatur stehen oder stellt sie über Nacht in den Trockenschrank (+60°C), falls man sie schnell verwenden möchte.

### **3.1.3 Bänderungs- Zytogenetik**

Eine Bande ist definiert als das Segment eines Chromosoms, das von den benachbarten Segmenten eindeutig dadurch unterschieden werden kann, dass es entweder heller oder dunkler erscheint, in Abhängigkeit der Färbungstechnik (Mitelman ,1995).

GTG- Banden (G- Bands by Trypsin using Giemsa) erhält man durch die Behandlung von Metaphasechromosomen mit dem proteolytischen Enzym Trypsin (0,075 %) für 18- 20 sec (je nach Alter des Präparates, Art der Aufarbeitung und Kondensationszustand der Chromosomen) und nachfolgender Spülung. Anschließend erfolgt eine Färbung mit 10 %iger Giemsa- Farblösung für 5 min bei Raumtemperatur.



### 3.2 Molekulargenetische Techniken zur Markierung der Sonden

#### 3.2.1 Nick Translation zum Einbau von ligandentragenden dNTP

Die Nick Translation wurde 1977 erstmalig von Rigby et al. beschrieben und ist somit das ältere der Standardverfahren zur Markierung von DNA.

Das Ziel dieser Methode ist der Einbau von markierten dUTP in die vorhandene DNA. Hierzu nutzt man die Eigenschaft der DNA- Polymerase I aus *E.coli*, die sequentielle Addition eines Nukleotids an den 3'- Terminus eines ‚Nicks‘ (Bruch einer Phosphodiesterbindung), mit der Eliminierung von Nukleotiden am 5'- Phosphoryl-Terminus des ‚Nicks‘ zu koppeln (Winnacker, 1985). Die dafür notwendigen Einzelstrangbrüche (Nicks) werden durch die DNase I in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  an statistisch verteilten Stellen der DNA hergestellt (Kelly et al., 1970.). Die Größe der Fragmente, die dabei entstehen, hängt von der Konzentration der DNase I ab (Mühlhardt, 1999). Die durch den für diese Arbeit verwendeten Kit (Boehringer Mannheim) hervorgerufene Länge von 200- 500 bp hat sich in der FISH als günstig erwiesen. Für die Markierung ersetzt man einen Teil der dTTP durch markierte dUTP.

Typisch für die Nick Translation ist, dass anders als bei der PCR keine Amplifikation stattfindet und somit eine mögliche Kontamination eine geringere Auswirkung hat. Demgegenüber braucht man für die Nick Translation relativ große Mengen an zu markierender DNA.

Die Firma Boehringer bietet Kits sowohl für den Einbau von Biotin/ Digoxigenin, als auch für direkt markierte dUTP an.

#### Protokoll für die Markierung mit Biotin/ Digoxigenin (Boehringer):

In einem Reaktionsgefäß sorgfältig mischen und kurz abzentrifugieren:

bis 1 µg	DNA
4 µl	Biotin- / DIG- Nick Translation Mix
ad 20µl	H <sub>2</sub> O

#### Protokoll für die Markierung mit direkt markierten Nukleotiden:

bis 1 µg	DNA
2,5 µl	dTTP : dUTP <sub>markiert</sub> im Verhältnis 2:1
2,5 µl	dATP (0,4 mM)
2,5 µl	dCTP (0,4 mM)
2,5 µl	dGTP (0,4 mM)
2 µl	10x Puffer
2 µl	Enzym (DNA Polymerase I, DNase I in 50% Glycerol)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

Man pipettiert die Zutaten auf Eis und inkubiert anschließend für 90 min bei 15°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 20 µl Stop- Mix oder durch Erhitzen für 10 min auf 65°C gestoppt. Das Gemisch wird dann mit 1xTE bis auf 100 µl aufgefüllt und über eine Sephadex- Säule von überschüssigen Nukleotiden/ Oligonukleotiden bis zu 20 bp getrennt.

### **Herstellung der Sephadex- Säulen:**

Eine 10ml Spritze wird mit silanisierter Glaswolle nach unten abgedichtet. Anschließend füllt man die Spritze mit Sephadex auf und zentrifugiert 1 min bei 3000 U/min. Gegebenenfalls wird die Spritze nach der Zentrifugation nochmals aufgefüllt und wieder bei 3000 U/min für 1 min zentrifugiert. Um die Säule zu reinigen, gibt man 100 ml 1xTE auf die Säule und zentrifugiert 3 min bei 3000 U/min. Die Säulen werden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Nach dem Abstoppen der Reaktion gibt man das Gemisch auf die Sephadex- Säule, die ähnlich einer Gelfiltrations- Chromatographie- Säule funktioniert, und zentrifugiert erneut 3 min bei 3000 U/min. Die Farbzusätze des Stop- Mixes dienen zur Kontrolle der Auftrennung. Die so markierte und gereinigte DNA kann nun gefällt werden.

### **3.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine der wichtigsten und weitverbreitetsten Methoden in der Molekularbiologie. Seit der Erstbeschreibung durch Mullis et al., 1986 und der Einführung der thermostabilen DNA- Polymerase (Saiki et al., 1988) kamen eine Menge Verbesserungen, Variationen und Erweiterungen hinzu. Eine Übersicht findet sich u.a. bei Mühlhardt (1999).

### **Folgendes Schema gilt für alle PCR- Reaktionen:**

- |                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1.Schritt: Denaturierung (Aufspaltung der Doppelstränge) der DNA</li><li>2.Schritt: Annealing (Binden des Primers)</li><li>3.Schritt: Elongation (Erstellung einer Kopie durch die Polymerase durch Verlängerung der Primer)</li></ol> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Diese Schritte können theoretisch solange wiederholt werden, bis Primer, Polymerase oder Nukleotide verbraucht sind. In der Praxis haben sich 30 Zyklen bewährt, da es ab einer gewissen Produktmenge zu einem Plateaueffekt kommt und die Vermehrungsrate stark abnimmt (Mühlhardt, 1999).

**Folgende Reagenzien sind für eine PCR notwendig:**

- Zu amplifizierende DNA (Template)
- Primer (in molarem Überschuss zum Template)
- Nukleotidtriphosphate (je 200  $\mu\text{M}$ )
- thermostabile DNA- Polymerase (z.B. AmpliTaq)
- Puffer (z.B. Tris- HCl, pH 8)
- Magnesium ( $\text{MgCl}_2$  ; 0,5- 2,5 mM)
- Salz (z.B. KCl)

Die Konzentration des Magnesiums hat Einfluss auf das Primerannaeling, die Denaturierung, die Produktspezifität und die Fehlerrate.

Da beide Stränge gleichzeitig amplifiziert werden, verdoppelt sich die DNA- Menge theoretisch mit jedem Zyklus. Tatsächlich liegt der durchschnittliche Multiplikationsfaktor bei ca. 1,55- 1,6, wobei die Vermehrungsrate zu Beginn (geringere Wahrscheinlichkeit des Aufeinandertreffens von Primer und Template) und zum Ende (Vermehrung der Pyrophosphate, zerstörte Nukleotide und Rehybridisierungen) geringer ist. Geht man von einem Multiplikationsfaktor von 1,5 und 30 Zyklen aus, kommt man auf eine Vermehrung von  $1,9 \times 10^5$  (Mühlhardt, 1999).

**3.2.2.1 DOP- PCR (Degenerate Oligonucleotide Primer-)**

Die DOP- PCR (Telenius et al., 1992) ermöglicht die Amplifikation von DNA- Sequenzen, ohne eine Sequenz zu kennen. Dazu werden sogenannte ‚universelle Primer‘ verwendet, die aus 22 Nukleotiden bestehen. In der Mitte befinden sich 6 Nukleotide, die zufällig gewählt werden (=N), so dass man folgende Primersequenz erhält: **5' CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3'**. Um eine möglichst unspezifische Amplifikation zu erhalten, wählt man eine relativ niedrige Annealingtemperatur (25°C) und eine Polymerase, die bei niedriger Temperatur arbeitet (Sequenase).

Die PCR wird unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Für die Amplifikation der in dieser Arbeit verwendeten Zentromere hat sich folgendes modifiziertes Protokoll nach Senger (1998, unpublizierte Daten) bewährt:

(Die Mengenangaben beziehen sich auf ein Reaktionsvolumen von 50 µl, die Endkonzentration steht in Klammern.)

Ansetzen von **Lösung A** ( 5 µl)

ca. 0,5 µg	Plasmid- DNA
0,6 µl	Sequenase Buffer (0,6x)
0,63	DOP- Primer (5 µM)
0,4 µl	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 200 µM)
ad 5 µl	H <sub>2</sub> O

Die Denaturierung erfolgt ohne Sequenase, da diese nicht thermostabil ist.

Ansetzen von **Lösung B** (0,75 µl)

1,31 µl	Sequenase Dilution Buffer
0,19 µl	Sequenase

Aufgrund der Thermostabilität des Enzyms werden nach jeder Denaturierung 0,25 µl dieser Lösung zugegeben (insgesamt 3x). Statt der für die DOP- PCR normalerweise üblichen 8 Sequenase- Zyklen, waren für die Amplifikation der Zentromere 3 Zyklen ausreichend.

Nach Ablauf dieser Niedrig- Temperatur- Zyklen schließt sich eine spezifische Amplifikation mit 30 Zyklen an. Hierzu wurde die AmpliTaq DNA- Polymerase, Stoffel Fragment und der dazugehörige Puffer verwendet. Diese Polymerase besitzt im Gegensatz zur AmpliTaq keine Exonukleaseaktivität und ist hitzestabiler.

Ansetzen von **Lösung C** (45 µl)

34,22 µl	H <sub>2</sub> O
5 µl	Stoffel Fragment Puffer (1x)
4,4 µl	dNTP (220 µM)
1,38 µl	Primer (1,1 µM)
5 µl	MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)

Durch die nachträgliche Zugabe von Enzym wird erreicht, dass Primer, die sich über die degenerierte Sequenz untereinander verbinden können, erst einen De-

naturierungsschritt durchlaufen, bevor aktive Polymerase vorliegt (Gabriele Sen-ger, unpublizierte Daten).

#### Ansetzen der **Lösung D** (5 µl)

4,9 µl	H <sub>2</sub> O
0,7 µl	Stoffel Fragment Puffer (1x)
0,7 µl	MgCl <sub>2</sub> (2,5mM)
0,7 µl	AmpliTaQ Polymerase Stoffel Fragment (1 U/µl*)

Zu Beachten ist, dass man die Reaktionsgefäße während des Zupipettierens nicht aus dem Thermocycler nimmt, da sonst die erforderlichen Temperaturen nicht gewährleistet sind.

\*1 Unit (U) ist definiert als die Menge Enzym, die 10 nmol dNTP pro 30 min in einer 10 minütigen Inkubation bei 74°C unter PCR- Konditionen einbaut [Angabe des Herstellers (Perkin Elmer)].

#### **DOP- PCR (Thermocycler- Programm)**

Zyklen	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	5min	Denaturierung
2	25°C	2:20min	Zugabe der Sequenase (Lösung B)/ Annealing
3	34°C	2min	Elongation (Sequenase)
4	90°C	1min	Denaturierung
5	Goto 2, 2 times (Zyklus 2- 4 werden 2x wiederholt)		
6	30°C	2:20min	Zugabe von Lösung C/ Annealing
7	92°C	1min	Denaturierung
8	56°C	2:20min	Zugabe von Lösung D/ Annealing
9	70°C	2min	Elongation (AmpliTaQ, Stoffel-Fragment)
10	0,1°/s bis 74°C		
11	92°C	1min	Denaturierung
12	56°C	1min	Annealing
13	70°C	2min	Elongation (AmpliTaQ, Stoffel-Fragment)
14	0,1°/s bis 74°C		
15	Goto 11, 31x (Zyklus 11- 14 werden 31x wiederholt)		
16	72°C	10min	Elongation (Zeit zum Auffüllen der begonnen Stränge)
17	4°C	for ever	

Um die für die Routinediagnostik notwendige Menge an DNA zu erhalten, wurden alle Zentromersonden nach der DOP- PCR noch 2x nach folgendem Protokoll amplifiziert (Endkonzentration in Klammern):

0,5 µl	DNA aus der DOP- PCR
68,5 µl	H <sub>2</sub> O
10 µl	Stoffel Fragment Puffer (1x)
8 µl	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 200 µM)
2,5 µl	DOP- Primer (1 µM)
10 µl	MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)
1 µl	AmpliTaq Polymerase Stoffel Fragment (0,1 U/µl)
100 µl	

### 3.2.2.2 Markierungs- PCR

Zur Markierung der Sonden- DNA wurde die AmpliTaq- Polymerase eingesetzt. Eingebaut wurden entweder Fluoreszenz- oder Hapten- gekoppelte dUTP. Dabei wurden jeweils ein Teil der dTTP durch markierte dUTP ersetzt. Dies ist für die jeweiligen dUTP unterschiedlich und ist in Tabelle 3.1 aufgelistet.

#### Protokoll für einen 20 µl Ansatz (Endkonzentration in Klammern):

2 µl	der zuvor amplifizierten DNA
1 µl	Replitherm Puffer (1x)
1 µl	DOP- Primer (2 µM)
s.u.	dNTP
2 µl	MgCl <sub>2</sub> (2,5 mM)
0,12 µl	AmpliTaq (0,03 U/µl)
ad 20 µl	H <sub>2</sub> O

**Tab.3.1 Für die Dop verwendete fluoreszenzmarkierte Nukleotide mit dem jeweiligen Anteil der restlichen dNTP (Endkonzentration in Bezug auf das Gesamtvolumen)**

Markierte Nukleotide	Endkonzentration	Endkonzentration der restl. dNTP
Biotin- dUTP	40 µM	dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM
Digoxigenin- dUTP	40 µM	dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM
SpectrumGreen- dUTP	100µM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 200 µM
SpectrumOrange- dUTP	20 µM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 200 µM
SpectrumRed- dUTP	20 µM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 200 µM
R110- dUTP	10 µM	dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM
Diethylaminocumarin- dUTP (DEAC)	100 µM	dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM
TexasRed- dUTP	50 µM	dATP, dCTP, dGTP je 200 µM, dTTP 100 µM

**Markierungs- PCR (CYCLER- Programm)**

Zyklen	Temperatur	Zeit	Beschreibung
1	92°C	3min	Initiale Denaturierung
2	91°C	1min	Denaturierung
3	56°C	1min	Annealing
4	70°C	2min	Elongation
5	Goto 2, 31x (Zyklus 2- 4 werden 31x wiederholt)		
6	72°C	5min	Elongation (Zeit zum Auffüllen der begonnen Stränge)
7	4°C	for ever	

**3.2.3 Quantifizierung der PCR- Produkte und Bestimmung der Fragmentlänge der PCR- Produkte**

Für die Quantifizierung der PCR- Produkte wurden mehrere Verfahren (nach Sambrook et al., 1989) getestet:

- Photometrische Messung bei 260nm
- Abschätzung mittels Dot- Quantifizierung. Hierzu wurde die DNA mit einem Standard in einer Verdünnungsreihe, die auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarose- Gel aufgetropft wurde, verglichen.
- Abschätzung mittels Elektrophorese- Gel durch Vergleich mit einem Längenstandard von Boehringer Mannheim. Hier wurde zumeist der Längenstandard II und VIII verwendet. Der Agarosegehalt betrug 1,2- 1,8%.

Die Bestimmung der Fragmentlänge erfolgte mit Hilfe der Elektrophorese. Hierzu wurde ein 1,8%iges Agarose- Gel hergestellt. Die PCR- Produkte wurden zusammen mit dem Längenstandard II oder VIII von Boehringer Mannheim aufgetragen und ca. 60- 80min bei 120 V und 300 mA laufen gelassen.

**3.2.4 Verkürzung der Fragmente mit DNase I**

Für die FISH eignen sich vorzugsweise Fragmente mit einer Länge von 50- 300bp (Rautenstraß and Liehr, 2002). Nach der DOP- PCR wiesen die meisten Zentromere jedoch eine Länge von 100 bis zu mehreren Kilobasen auf. Deshalb wurde, wenn notwendig, vor der Hybridisierung ein DNase- Verdau angeschlossen.

**Protokoll für den DNase- Verdau:**

ca. 15µl PCR- Produkt  
5µl 10x PCR- Puffer (AmpliTaq- Puffer)  
10µl MgCl<sub>2</sub> (25mM, s. MgCl<sub>2</sub> für AmpliTaq)  
0,1U DNase  
ad 25 µl Aqua dest.

Die Lösung wird auf Eis zusammenpipettiert und bei 37°C für 20min inkubiert, mit nachfolgender Erhitzung auf 65°C für 15min zum Abstoppen der DNase.

Wird mehr oder weniger DNA verdaut, muss die DNase Konzentration entsprechend erhöht oder verringert werden.

**3.3 In *situ* Hybridisierung an DNA**

Für die in *situ* Hybridisierung nutzt man die Eigenschaft der DNA, sich zu Doppelsträngen zu verbinden. Man denaturiert dazu sowohl die Sonden- DNA, als auch die Ziel- DNA und wählt anschließend die Bedingungen so, dass möglichst nur komplementäre Stränge ein Hybrid bilden.

Die Qualität der Hybridisierungssignale hängt im wesentlichen von der Sonde, den Diffusionsbedingungen, den Fluoreszenzstoffen und dem Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund ab.

**3.3.1.1 DNA- Sonden**

Zur DNA in *situ* Hybridisierung wurde in der vorliegenden Arbeit nur nichtradioaktiv markierte DNA eingesetzt.

Die Zentromersonden (s.2.1) wurden freundlicherweise von Mariano Rocchi, Italien zur Verfügung gestellt und entweder durch Nicktranslation markiert (s. 3.2.1) oder mit Hilfe der DOP- PCR amplifiziert (s.3.2.2.1) und markiert (s.3.2.2.3).

Weiterhin kamen Mikrosezierungssonden aus der Humangenetik Jena zum Einsatz, die mit Hilfe der DOP- PCR amplifiziert und markiert wurden.

Um den OT optimal auszunutzen, werden für die FISH pro OT zwei verschiedene Sonden (Einfarb- FISH) oder Sondenkombinationen (Zwei- bis Mehrfarb- FISH) eingesetzt. Daher wird im Folgenden mit „halben OT“ gerechnet. Je nach Sonden- typ werden pro halben OT verschiedene DNA- Mengen eingesetzt.



### 3.3.1.2 Vorbehandlung von Chromosomenpräparaten

Nach dem Altern und vor der Hybridisierung der OT müssen diese vorbehandelt werden. Ein RNase- Verdau hat sich bei der Arbeit mit Zentromeren nicht als sinnvoll erwiesen, während ein Pepsinverdau notwendig ist, um verbliebene Plasmareste zu entfernen und die Zelle für die DNA- Moleküle durchlässiger zu machen, bzw. den Hintergrund bei der Hybridisierung zu verringern (Proteine bieten unspezifische Bindungsstellen vor allem für Avidin/ Anti- Digoxigenin, aber auch für direkt markierte Sonden).

Die mit Mitosen versehenen OT werden für 5 min in eine 37°C warme Pepsinlösung gestellt. Anschließend erfolgt ein 5 minütiges Waschen in 1xPBS, um die Reaktion zu stoppen.

Um die Chromosomen richtig zu fixieren ist zusätzlich eine Behandlung mit Paraformaldehyd notwendig. Hierzu werden die OT 10 min mit einer Postfixierungslösung inkubiert, 5 min in PBS gestellt und anschließend durch die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert (Liehr et al., 1995).

### 3.3.1.3 Fällung der DNA

Um die in der Markierungsreaktion (PCR oder Nick Translation) gewonnene DNA von ungebundenen Nukleotiden zu reinigen und das Volumen zu verringern, muss die DNA vor der weiteren Verarbeitung gefällt werden. Hierzu wird zu der in der PCR- / Nick Translationslösung gelösten DNA tRNA, 1/10 des Volumens Natriumacetat (0,3M) und die zweieinhalbfache Menge 100%igen Alkohols hinzugegeben (=70 Vol- %) und bei -80°C für 15 min (bzw. bei -20°C über Nacht) kaltgestellt. Die tRNA erhöht die absolute Ausbeute an DNA (Sambrook et al., 1989) und verringert bei der Hybridisierung die Bindung der Sonde an unspezifische Sequenzen (Leitch et al. 1994). Der Alkohol verdrängt die Wassermoleküle und erleichtert somit die Präzipitation der Nukleinsäuren.

Die eingesetzte Menge an tRNA ist ein Erfahrungswert und betrug für die meisten Sonden 100 µg pro 20 µl PCR- bzw. Nick Translations- Ansatz.

Anschließend wird die gefällte DNA bei 4°C und 15300 U/min abzentrifugiert und das Pellet getrocknet.

### **3.3.1.4 Denaturierung und Prähybridisierung von DNA- Sonde und Ziel- DNA auf dem Objektträger**

Da DNA bei Raumtemperatur hauptsächlich doppelsträngig vorliegt, muss sie vor der Hybridisierung denaturiert werden. Eine zu kurze Denaturierungszeit führt zu einem schlechteren Hybridisierungsergebnis, während zu lange Zeit und zu hohe Temperaturen eine Alteration der Chromosomenstruktur zur Folge haben.

#### **Denaturierung der Sonden- DNA:**

Die gefällte und getrocknete DNA wird in dem auf ca. 37°C vorgewärmten Hybridisierungsmix gelöst. Dextran ist ein inertes Polymer mit hohem Molekulargewicht, das die Geschwindigkeit der Hybridisierung verdreifacht. Es bildet eine Matrix in der Hybridisierungslösung, so dass die Sonde lokal konzentriert wird, ohne die Stringenz zu beeinflussen (Leitch et al., 1994). Das Formamid destabilisiert die Wasserstoffbrückenbindungen und setzt so die Schmelztemperatur der DNA herab (Casey and Davidson, 1977).

#### **Prähybridisierung der Sonden:**

Um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu unterdrücken, wurde die Sonden-DNA vor der eigentlichen Hybridisierung mit COT- 1- DNA prähybridisiert. COT- 1- DNA besteht aus repetitiven Sequenzen, v.a. aus der Alu I und Kpn I- Familie (Landegent et al., 1987) und wird im Zusammenhang mit den Zentromeren nur in sehr geringen Mengen (zwischen 0,5 und 2 µg) eingesetzt. Für die Prähybridisierung werden die Sonden bei 75°C für 5 min denaturiert und anschließend für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Sonde sollte im Anschluss sofort auf den OT aufgetragen werden oder vorrübergehend bei 4°C gelagert werden.

#### **Denaturierung der auf dem OT fixierten DNA:**

Die OT werden auf einer 72°C warmen Heizplatte kurz vorgewärmt und mit der Denaturierungslösung (s.2.10) eingedeckelt. Die Denaturierungsdauer für Lymphozyten, kultivierte Fruchtwasserzellen und Knochenmarkszellen beträgt etwa 3 min. Die OT werden dann von der Heizplatte direkt in -20°C kalten Alkohol (70%) getaucht, um eine Rehybridisierung der beiden Stränge zu verhindern und anschließend durch die aufsteigende Alkoholreihe dehydriert.

### 3.3.1.5 Die eigentliche in *situ* Hybridisierung

Für die Hybridisierung wird die denaturierte und prähybridisierte Sonden- DNA auf den denaturierten OT gegeben und mit einem 24 x 24 cm Deckglas eingedeckelt. Um das Austrocknen zu verhindern, wird das Deckglas mit Rubber Cement (Fixogum) abgedichtet und der OT in eine vorgewärmte feuchte Kammer gelegt. Für eine gute Signalqualität der Zentromersonden ist eine Hybridisierung über Nacht (12- 16 Std.) völlig ausreichend.

### 3.3.1.6 Die Posthybridisierungswaschungen

Um unspezifische Bindungen zu verringern, schließt sich an die Hybridisierung eine Waschung an. Grundsätzlich gilt, dass heterologe Bindungen weniger stabil sind, als homologe. Die Stringenz der Waschlösung hängt v.a. von der Nähe der Temperatur zur Schmelztemperatur der Sonden- DNA, von der Ionenstärke und der Formamidkonzentration ab. Für das Waschen der Zentromersonden wurde mit 2 verschiedenen Protokollen gearbeitet:

➤ **das Waschen bei 42°C (gebräuchlichere Methode):**

3 x 5 min in FA/SSC

3 x 5 min 2xSSC

➤ **Rapid- Wash:**

2 min in 0,4xSSC (68°C)

1 min in 4xSSC/TW bei RT

### 3.3.1.7 Die Sonden- Detektion

Während direkt markierte Sonden nach dem Waschen direkt sichtbar sind, müssen indirekt markierte Sonden zunächst mit Fluoreszenz- gekoppelten Antikörpern detektiert werden. In dieser Arbeit wurde Biotin zumeist mit FITC, Cy3 oder Cy5 und Digoxigenin mit Rhodamin oder Cy5.5 detektiert. Bei manchen Antikörpern ist eine Verstärkung über das Sandwich- Prinzip möglich.

Um unspezifische Bindungen abzublocken, werden die Antikörper in zuvor angesetztem Milchpulver gelöst. Hierzu löst man 0,5 g fettfreie Trockenmilch (Marvel) in 5 ml 4xSSC/TW. Die Endkonzentration der Antikörper variiert je nach Antikörper:

Antikörper	Menge/ 50 µl Marvel/ SSC/TW	Beschreibung
Streptavidin-FITC	0,1 µl	AK gegen Biotin
Avidin Cy5	0,5 µl	AK gegen Biotin
Biotinyliertes Antiavidin	0,5 µl	AK gegen Avidin, gekoppelt an Biotin (zur Verstärkung von FITC und Cy5)
Anti- DIG- Cy5.5(mouse)	5 µl	AK gegen Digoxigenin
Anti- mouse- Digoxigenin	5 µl	AK gegen Anti- DIG- Cy5.5(mouse)

Die mit Marvel/4xSSC/TW angesetzten AK werden auf den OT pipettiert und mit einem 24x60cm Deckglas abgedeckt. Anschließend wird bei 37°C für 30 min in der feuchten Kammer inkubiert.

Nach jeder Inkubation erfolgt ein Waschschrift:

2x4 min in 4xSSC/TW auf dem Schüttler

Nach dem letzten Waschschrift wird der OT kurz mit destilliertem Wasser abgespült und anschließend getrocknet.

### 3.3.1.8 Die Gegenfärbung und das Haltbarmachen der Präparate

Um ein schnelles Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern, wird der hybridisierte und detektierte OT mit ca. 15 µl Antifade (Vectashield) eingedeckelt (Johnson et al., 1981). Um die Chromosomen sichtbar zu machen (Gegenfärbung), mischt man dem Antifade DAPI (4'6'- Diamidino- 2- Phenylindol) zu. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sein Absorptionsmaximum bei 353 nm und sein Emissionsmaximum bei 416 nm hat und an die kleine Krümmung der DNA- Doppelhelix bindet (Wilson et al., 1990). In der FISH ist DAPI weitverbreitet, da es eine der Giemsa- Bänderung ähnliche Bänderung hervorruft (Tucker et al., 1988) und man so die einzelnen Chromosomen zur Kontrolle identifizieren kann. Die Fluoreszenz von DAPI wird durch AT- reiche Sequenzen stark verstärkt (Wilson et al., 1990), wodurch sich die stärkere Fluoreszenz der Zentromerregionen erklärt.

Der fertige OT kann sofort unter dem Fluoreszenz- Mikroskop betrachtet oder bei -20°C bis zu mehreren Jahren (je nach Fluoreszenzfarbstoff) gelagert werden.

### 3.3.1.9 Fluoreszenzmikroskopie und Dokumentation

Belichtung und Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mit einem Axioplan 2 Fluoreszenz- Mikroskop (Zeiss®), an das eine CCD- Videokamera (IMAC®) gekoppelt ist. Um die einzelnen Fluoreszenzen zu trennen, werden zwischen die Quecksilberlampe und die Kamera Filter eingeschoben.

Für die Auswertung und Dokumentation der Hybridisierungsergebnisse ist eine spezielle Software notwendig. Für diese Arbeit wurde das Software- Programm ISIS (MetaSystems GmbH, Altlußheim) verwendet. Den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen wird ein Grauwert zugeordnet, den das Programm in eine Falschfarbe umwandelt. Diese werden in verschiedenen Kanälen gespeichert und können somit einzeln bearbeitet werden. Außerdem bietet das Programm die Möglichkeit, ein Karyogramm zu erstellen.

Zur Überlagerung aller 6 Kanäle (DAPI, SO, SR, SG, Cy5, DEAC), zur Falschfarbenuordnung sowie zur Bildbearbeitung wurde die Software Adobe Photoshop 5.5 verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vorarbeiten für die Etablierung der Methode

#### 4.1.1 Hybridisierung einzelner Zentromersonden

Die für diese Arbeit verwendeten Zentromersonden wurden zunächst mit Hilfe der Nicktranslation markiert und hybridisiert, um die Qualität der Sonden zu überprüfen und mögliche Kreuzhybridisierungen auszuschließen. Die Markierung wurde mit Biotin- dUTP durchgeführt, anschließend wurde mit Avidin- FITC detektiert.

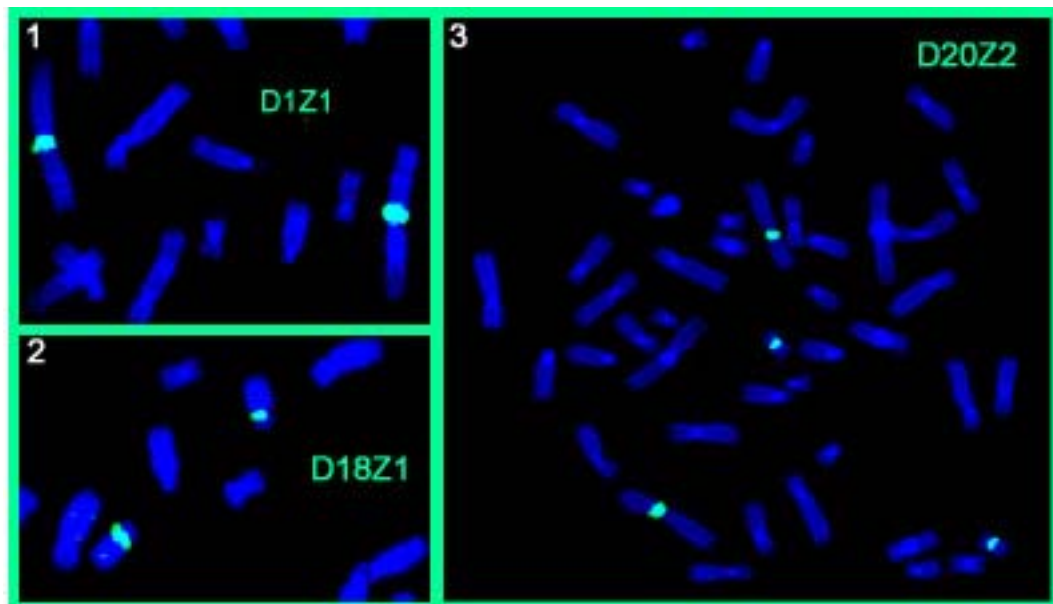


Abb. 4.1: Hybridisierung der einzelnen Zentromersonden nach Biotin- Markierung mittels Nicktranslation und Detektion mit Streptavidin- FITC zur Überprüfung der Qualität. 1) 1q12. 2) Zentromer 18. 3) Zentromer 2 und 20.

#### 4.1.2 Amplifizierung und Markierung der DNA- Sonden mittels DOP- PCR

Die Amplifikation und Markierung der Sonden- DNA erfolgte mittels DOP- PCR, bei der die Sequenzen über unspezifischer Primer vervielfältigt werden. Dabei zeigte sich, dass drei Sequenase- Zyklen statt der sonst üblichen 8 Zyklen ausreichend waren, um für weitere Amplifikationen genügend Primer einzubauen. Die

Ausgangsmenge (0,5ng- 100ng) spielte dabei keine entscheidende Rolle für die Endmenge.

Zur Markierung der durch die DOP- PCR erhaltene Sonden- DNA, verwendet man die gleichen Primer wie bei der DOP- PCR, ersetzt jedoch einen Teil der dTTP durch markierte dUTP. Außerdem wird hier die AmpliTaq Polymerase (Aktivitätsoptimum bei 74°C und einem pH von 8) und ein entsprechender Puffer verwendet. Auch hier wurde zunächst mit Biotin markiert und mit Avidin- FITC detektiert, um die Qualität der Sonden zu überprüfen. Zur Optimierung der Qualität wurden für jede Zentromersonde zwischen einem und fünf Varianten bezüglich der Sondenkonzentration ausgetestet.

Nach Testung der so amplifizierten und markierten Sonden, wurden alle Zentromersonden erneut amplifiziert, um einen Stock von 100µl DNA herzustellen. Diese DNA diente als Ausgangs- DNA für alle weiteren Markierungen.

#### **4.1.3 Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe**

Da für den Zentromer- Mix 5 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe benötigt werden, wurden verschiedene direkt und indirekt markierte Nukleotide getestet. Es wurden SG- dUTP und R110- dUTP miteinander verglichen und verschiedene Verhältnisse von dUTP zu dTTP getestet. Dabei erwies sich SG- dUTP für die Markierung von Zentromeren als das geeignetere, da eine bessere Signalausbeute erzielt werden konnte. Ebenso wurde mit SR- dUTP, TR- dUTP von Molecular Probes und TR- dUTP von NEN verfahren, wobei SR- dUTP sich für die Markierung von Zentromeren als am besten geeignet erwies.

Im Weiteren wurde das Diethylaminocumarine- dUTP getestet, welches sich als vorteilhaft gegenüber Digoxigenin- dUTP (in einem zweiten Schritt detektiert mit  $\alpha$ -DIG- Cy5.5) herausstellte.

SO- dUTP und BIO- dUTP (in einem 2. Schritt detektiert mit Streptavidin- Cy5) zeigten sehr gute Signalausbeuten, so dass keine weiteren Nukleotide mit ähnlicher Wellenlänge getestet werden mussten.

Jede Zentromersonde wurde mit den verwendeten Fluorochromen getestet, um die geeignete Sondenkonzentration für das jeweilige Fluorochrom zu bestimmen (etwa 20 Varianten pro Sonde).

#### **4.1.4 Quantifizierung der eingesetzten DNA- Mengen und Überprüfung der Fragmentlängen mittels Elektrophorese**

Zur Quantifizierung wurde ein Aliquot der DNA photometrisch bei 260nm gemessen bzw. mit Hilfe der Dot- Quantifizierung abgeschätzt. Hierzu wurde die DNA mit einem Standard in einer Verdünnungsreihe, die auf ein ethidiumbromidhaltiges Agarosegel aufgetropft wurde, verglichen.

Da die Fragmentlänge der Sonden- DNA eine wichtige Rolle für die Qualität der Hybridisierung spielt (s. 3.2.4), wurde ein Aliquot der DNA auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Länge der Fragmente wurde mit dem Längenstandard II oder VIII von Boehringer Mannheim verglichen. Zumeist wies die Zentromersonden- DNA nach DOP- PCR eine Längengemisch von 200 bp bis weit über 20 000 bp (s. Abb.4.2) auf. Die einzelnen Zentromersonden unterschieden sich allerdings erheblich in der Länge, sowohl vor als auch nach DOP- PCR.

#### **4.1.5 Optimierung des Signal- Hintergrund- Verhältnisses**

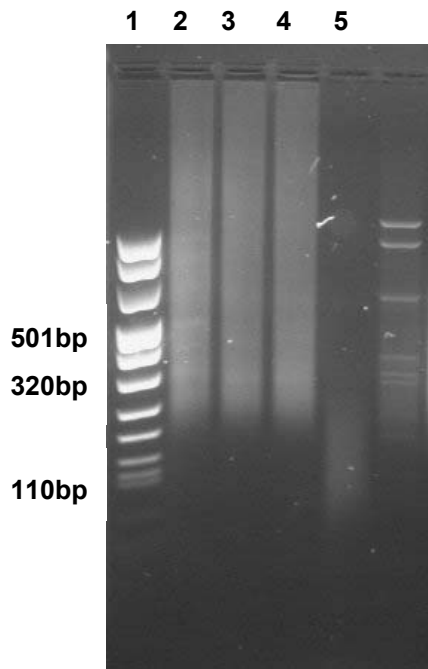
Das Verhältnis von spezifischem Signal zu unspezifischem Hintergrund nach DOP- PCR und Hybridisierung war im Vergleich zur Markierung mit Nicktranslation zunächst nicht zufriedenstellend. Deshalb wurden verschiedene Ansätze getestet, um die Hybridisierungsergebnisse zu optimieren.

Hierzu wurden verschiedene DNA- Konzentrationen in der Hybridisierung eingesetzt, die für jedes Zentromer unterschiedliche Optima aufwiesen.

Da auch die Stringenz des Waschens eine große Rolle spielt, wurden verschiedene Temperaturen und Salzkonzentrationen getestet.

Auch die Fragmentlänge hatte einen entscheidenden Einfluss auf den spezifischen Hintergrund, so dass Versuche mit DNase durchgeführt wurden. Hier erwies sich eine Fragmentlänge von 50- 300bp als optimal. Es wurden sowohl verschiedene Konzentrationen an DNase (0,0001U- 0,1U/ $\mu$ l), als auch verschiedene Inkubationszeiten (10, 20, 30, 60, 120 min) getestet, um die optimale Länge zu erreichen. Diese wurde mit Hilfe von Gelelektrophorese und einem Längenstandard überprüft. Als optimal für die meisten Zentromere erwies sich eine DNase- Konzentration von 0,1U/ 20 $\mu$ l markiertem DNA- Ansatz und eine Inkubation von 20 min bei 37°C.





**Abb. 4.2: Elektrophorese- Gel nach 1h Laufzeit bei 120V. Die erste und fünfte Spur zeigen den Längenstandard VIII und II von Boehringer Mannheim. Die zweite, dritte und vierte Spur zeigen Zentromer 4 nach DOP-PCR und anschließendem DNase Verdau mit 0,0001U/ 20µl Sonden- DNA nach 10, 30 und 60 min Inkubation. Die fünfte Spur zeigt Zentromer 4 nach DOP-PCR und anschließendem DNase Verdau mit 0,1U/ 20µl Sonden- DNA nach 10 min Inkubation. Die Fragmente der Spur 5 besitzen die für die FISH- optimale Länge von 100-300 bp.**

#### 4.1.6 Der Einsatz von COT- 1- DNA

Verschiedene Konzentrationen an COT- 1- DNA wurden getestet, um mögliche Kreuzhybridisierungen zu unterdrücken. Dabei erwies sich bei Einzelhybridisierungen eine Konzentration von ca. 0,05µg/µl Hybridisierungsansatz als ausreichend. Wurden alle Zentromere zusammen hybridisiert, benötigte man eine Konzentration von ca. 0,2µg/µl.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Sonden mit der COT- 1- DNA 10 min bei 37°C prähybridisiert.

#### 4.2 Etablierung verschiedener zentromerspezifischer M-FISH- Verfahren

Nachfolgend wird die Etablierung der verschiedenen zentromerspezifischen M-FISH- Verfahren (cenM-FISH, CenM54-FISH, AcroCenM-FISH, cenMM-FISH) beschrieben.

## 4.2.1 Etablierung des cenM-FISH

### 4.2.1.1 Anpassung der Konzentrationen und Auswahl der Farbkombinationen

Die spektrophotometrische Bestimmung der DNA- Konzentration nach der PCR erwies sich als schwierig, da in den Sonden außer der spezifischen Zentromer-DNA auch Primer, Nukleotide, Plasmid- und zum Teil Bakterien- DNA enthalten waren. Dies erwies sich zwar in der FISH nicht als störend, verfälschte jedoch die Messwerte. Deshalb wurden die für die Signalausbeute nötigen Menge für die einzelnen Zentromere empirisch ermittelt. Die Menge der einzelnen Sonden im cenM-FISH war zumeist etwas geringer als bei der Einzelhybridisierung. Es wurden Mengen zwischen  $\frac{1}{2}$  und  $\frac{1}{50}$  des Markierungsansatzes (20 $\mu$ l) getestet. Je nach Zentromersonde wurden für eine Einzelhybridisierung zwischen  $\frac{1}{5}$  und  $\frac{1}{20}$  des Markierungsansatzes eingesetzt. Die verwendeten Mengen der einzelnen Zentromersonden für die Mixe finden sich in den Tabellen 4.1- 4.3.

Bei der Auswahl der Farbkombinationen mussten in erster Linie die Sonden berücksichtigt werden, die mehrere Zentromere abdeckten. Wie in der Einleitung (s.1.2.2.2.1) beschrieben, sind nicht für alle Zentromere spezifische Sonden verfügbar. So musste zum Beispiel zur Sonde D2Z1 (spezifisch für Chromosom 2 und 20) eine Chromosom- 20 spezifische Sonde (D20Z2) eingesetzt werden. Damit deckt die eine Sonde sowohl Zentromer 2 als auch 20 ab, während die andere Sonde nur spezifisch auf Chromosom 20 bindet. Zur sicheren Unterscheidung beider Chromosomen wurde nun zusätzlich zu der für beide Sonden gewählten Farbe SG, die Farbe SO für die Sonde D20Z2 eingesetzt.

Außerdem erwies es sich als günstig, 3- fach Kombinationen für die Zentromere (z.B. Chromosom 8, 12...) zu verwenden, die in der Einzelhybridisierung besonders kräftige Signale ergaben. Eine Übersicht über die verwendeten Farbkombinationen sowie Mengen des verwendeten Endproduktes findet sich in Tabelle 4.1.

Tab. 4.1: Schema der Markierung der Zentromersonden für die cenM-FISH bzw. cenM54-FISH (Midi54 zusätzlich) mittels DOP- PCR. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Menge des verwendeten Endproduktes nach PCR.

Zentromer	Kombination	SO	SR	SG	DEAC	BIO
1	SG/BIO			60µl		30µl
2+20	SG			60µl		
3	SR/DEAC		20µl		20µl	
4	BIO					50µl
5+19	SR		20µl			
5/6	SO/SR	20µl	20µl			
6	SO/SR/SG	20µl	20µl	40µl		
7	SR/BIO		20µl			20µl
8	SO/SG/BIO	20µl		40µl		20µl
9	SO/SR/BIO	20µl	50µl			50µl
10	SG/DEAC			100µl	50µl	
11	DEAC/BIO				50µl	50µl
12	SR/SGBIO		20µl	40µl		20µl
13+21	SO	20µl				
14+22	DEAC				20µl	
15	SR/SG		20µl	40µl		
16	SO/SG/DEAC	30µl		60µl	30µl	
17	SO/DEAC/BIO	20µl			20µl	20µl
18	SO/BIO	20µl				20µl
20	SO/SG	20µl		40µl		
22	SO/DEAC	60µl			60µl	
X	SR/SG/DEAC		20µl	40µl	20µl	
Y	SR/DEAC/BIO		20µl		20µl	
Midi 54	SO/SR/DEAC/ BIO	20µl	20µl		20µl	20µl

Nach Markieren der Sonden entsprechend dem aufgeführten Schema (Tab. 4.1), wurden sämtliche Ansätze zusammenpipettiert, gut durchmischt und anschließend auf 25 Portionen aufgeteilt. Jede Portion wurde dann einzeln gefällt und getrocknet, sie reichte für einen Ansatz, d.h. ½ OT.

#### 4.2.1.2 Test der Methode an normalen Chromosomen

Die Methode wurde zunächst an Chromosomen von 5 unauffälligen Kontrollpersonen getestet und das Ergebnis durch Identifikation der Chromosomen mittels Giemsa- ähnlicher DAPI- Bänderung überprüft (s. Abb. 4.3a+b).

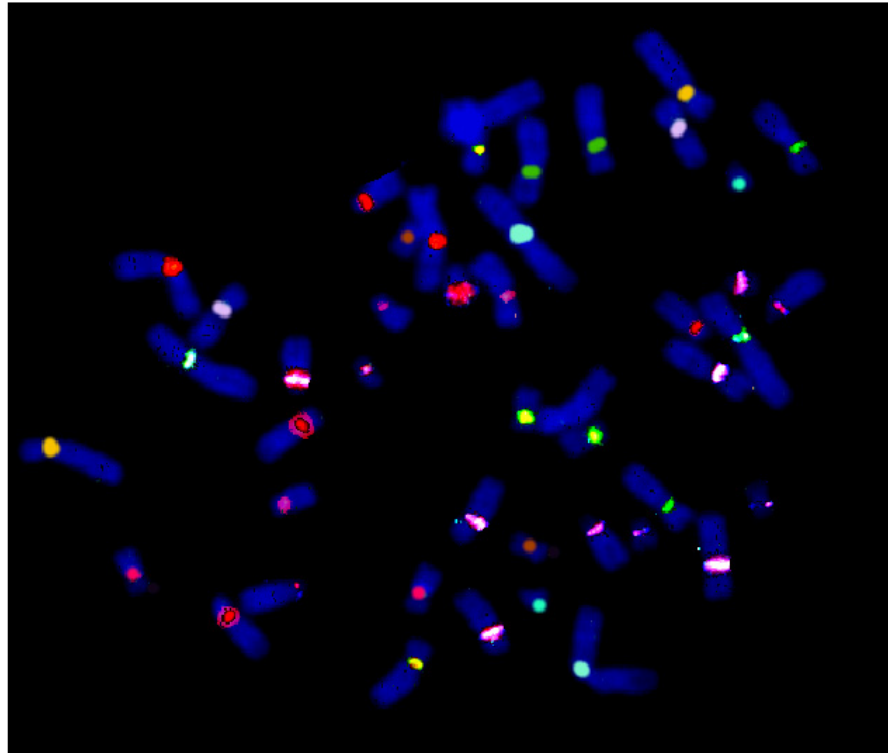


Abb. 4.3a: Unauffällige weibliche Metaphaseplatte nach Hybridisierung des cenM-Mixes auf normale Chromosomen. Die Markierung der einzelnen Sonden erfolgte nach in Tab. 4.1 aufgeführtem Schema. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden den einzelnen Chromosomen nachträglich Falschfarben zugeordnet.

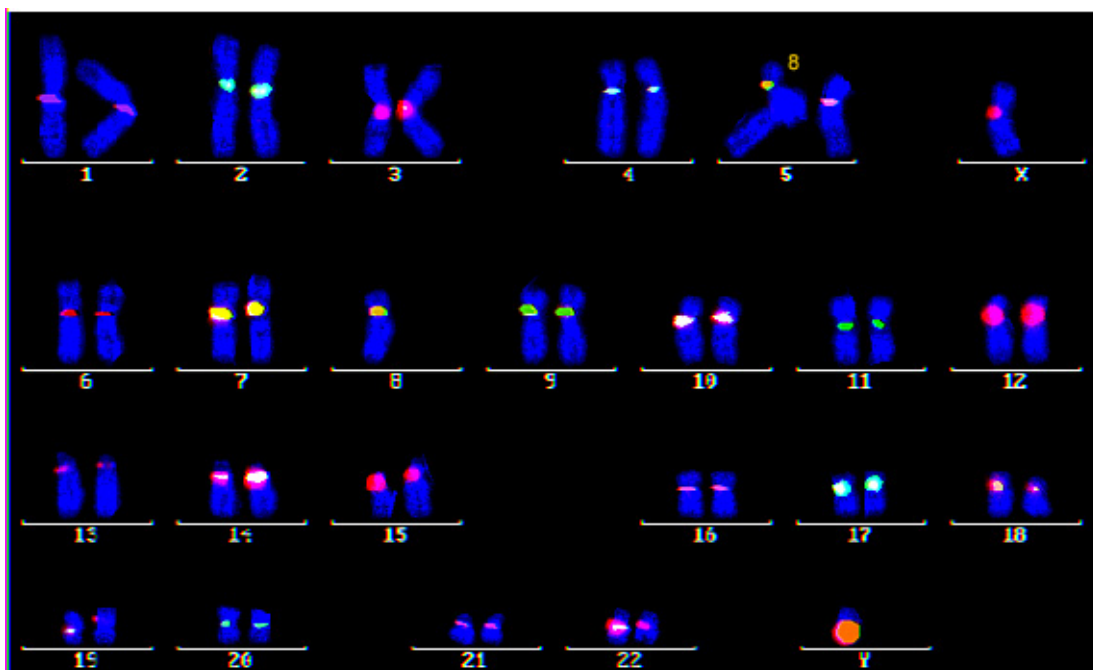


Abb. 4.3b: Unauffälliger männlicher Karyotyp nach Hybridisierung des cenM-Mixes auf normale Chromosomen. Die Markierung der einzelnen Sonden erfolgte nach in Tab. 4.1 aufgeführtem Schema. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden den einzelnen Chromosomen nachträglich Falschfarben zugeordnet.

### 4.2.2 Etablierung des cenM54-FISH

Für die cenM54-FISH wurde dem CenM-FISH-Mix lediglich eine, alle p-Arme der akrozentrischen Chromosomen abdeckende Sonde (Midi54) zugefügt. Diese Sonde bindet außerdem in der perizentrischen Region von Chromosom 9. Für diese wurde die freie Farbkombination SO/DAC/Cy5/SR gewählt (s. auch Tab. 4.1).

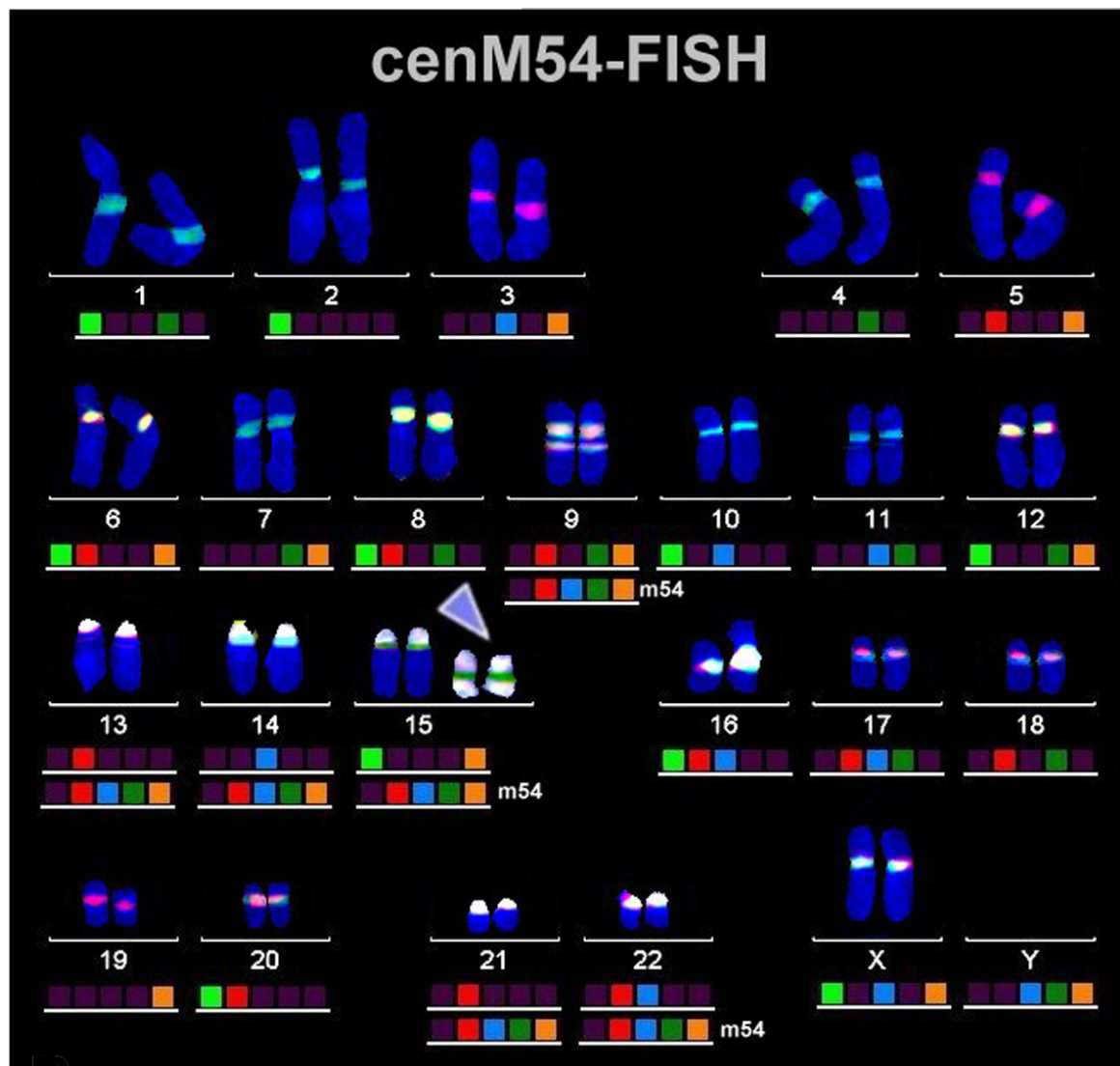
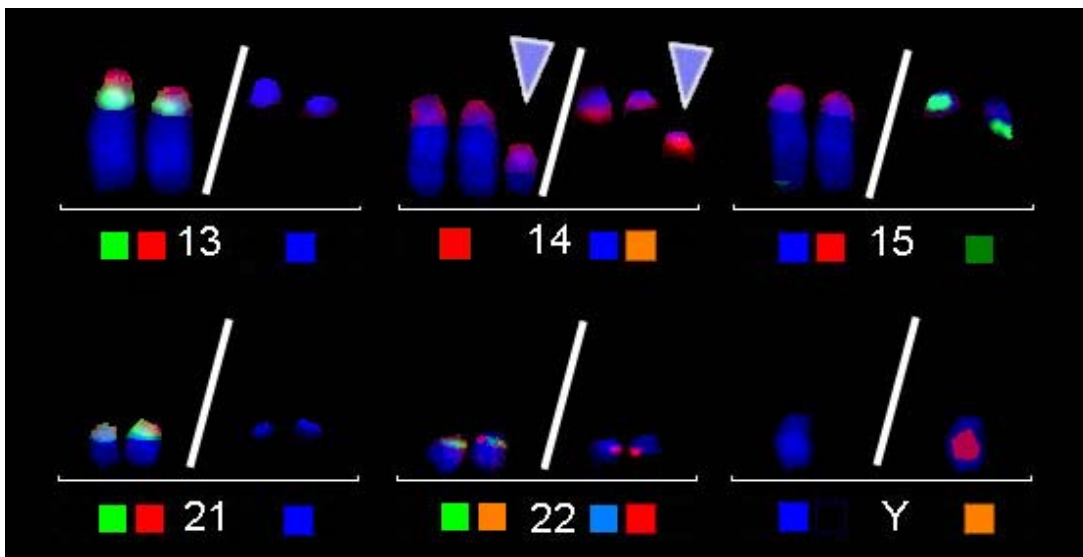


Abb. 4.4: Karyotyp nach Hybridisierung mit dem CenM54-Mix. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden den einzelnen Chromosomen Falschfarben zugeordnet. Die farbigen Kästchen unter den einzelnen Chromosomen zeigen die Farbkombinationen der einzelnen Zentromersonden (s. auch Tab. 4.1). Das unterhalb des Zentromer 9 gelegene Signal kommt durch eine Kreuzhybridisierung der Sonde Midi54 zustande. Der Pfeil zeigt 2 zusätzliche Isochromosom 15p, die durch den cenM54-Mix vollständig charakterisiert werden (siehe auch Nietzel et al., 2002). (SpectrumGreen, SpectrumOrange, DEAC, Cy5, SpectrumRed).

### 4.2.3 Etablierung des AcroCenM-FISH

Für den AcroCenM-FISH- Mix wurde im wesentlichen ähnlich verfahren, wie für den cenM-FISH- Mix.

Bis auf Zentromer 15 wurden alle Zentromere mit der DOP- PCR amplifiziert und markiert (s. Tab.4.2). Zentromer 15 wurde mit Nicktranslation Biotin- markiert, da damit bessere Signalintensitäten erreicht werden konnten. Nach der Markierung wurde die DNA aller Sonden (bis auf Midi54 und Zentromer 15) zusammen pipettiert und auf 10 Portionen aufgeteilt. Es zeigte sich, dass sich das Hintergrund- Signal- Verhältnis nach DNase- Behandlung deutlich verbesserte, so dass vor der Hybridisierung jeder Ansatz 20min bei 37°C mit 0,1U DNase inkubiert wurde. Anschließend wurde die Nicktranslations- markierte Zentromer 15- Sonde zupipettiert. Die Midi54- Sonde wurde getrennt denaturiert und prähybridisiert, während der Rest des Mixes nur denaturiert wurde. Anschließend wurde alles zusammen auf den OT aufgetragen. Zur Optimierung des Mixes waren etwa 15 Versuche notwendig.



**Abb. 4.5: AcroCenM-FISH:** Darstellung aller akrozentrischen Chromosomen und des Y-Chromosoms. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde jede Farbe einzeln aufgeführt. Die farbigen Kästchen unter den einzelnen Chromosomen zeigen die Farbkombinationen der einzelnen Zentromersonden (s. auch Tab. 4.1). Der Pfeil zeigt einen von Chromosom 14 stammenden satelliten-tragenden Marker.  
(SpectrumGreen, SpectrumOrange, DEAC, Cy5, SpectrumRed).

Tab. 4.2: Schema für die Markierung der Zentromersonden für den AcroCenM- Mix. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Menge des verwendeten Endproduktes nach Markierung.

Zentromere	Kombination	SO	SR	SG	DEAC	BIO
Zentromer 13/ 21	SG			10µl		
Zentromer 14/ 22	SR		2,5µl			
Zentromere 15	BIO					20µl
Zentromer 22	SG			5µl		
Yq12	SR/DEAC		2,5µl		2,5µl	
NOR (Satellitenregion)	SO	15µl				
Midi54 (p- Arme d. Acrozentrischen)	DEAC				6µl	

Beide Sondenmixe wurden zunächst an normalen Metaphasechromsomen von 3 verschiedenen Testpersonen getestet (Ergebnis nicht gezeigt).

#### 4.2.4 Kombination von cenM-FISH und M-FISH (cenMM-FISH)

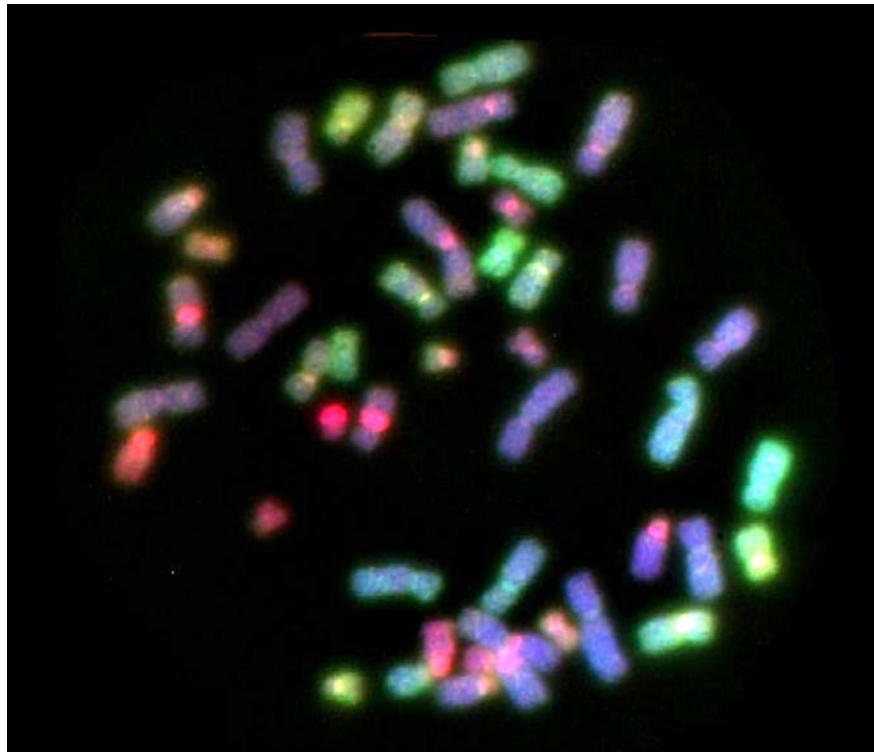
Im Anschluß wurden Versuche zur Kombination der cenM-FISH mit der M-FISH (cenMM-FISH) unternommen. Hierzu wurden die Farbkombinationen jedes Zentromers so umgestellt, dass sie sich von der des entsprechenden Ganzchromosoms unterschieden. Nur so konnte eine sichere Trennung von Zentromer- bzw. Euchromatinsignal gewährleistet werden (s. Tab.4.3).

Es wurde versucht, alle Zentromere, die mit dem gleichen spezifischen Fluorochrom markiert werden, zusammenzufassen, um die Markierung zu vereinfachen und den Zeitaufwand zu verringern. Hierzu waren zehn Versuche notwendig, um die Konzentration der einzelnen Zentromere an die Signalstärke anzupassen und die optimale Menge an Produkt für die Hybridisierung zu bestimmen. Für die verschiedenen Fluorochrome waren hier unterschiedliche Mengen notwendig.

Bezüglich der Kombination des cenM-FISH- und des M-FISH- Mixes wurden bisher nur 8 Hybridisierungen an Chromsomen normaler Testpersonen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl verschiedene Konzentrationen der beiden Mixe als auch verschiedene COT-1- DNA- Konzentrationen getestet (vorläufiges Ergebnis s. Abb.4.6).







**Abb. 4.6:** Vorläufiges Ergebnis einer Kombination der cenM-FISH mit der M-FISH. Gezeigt sind Metaphasechromosomen einer normalen Testperson. Das Bild wurde mit Hilfe eines 8- Filtermikroskops (Firma Zeiss) erstellt.

### **4.3 Einsatz der Methoden zur Diagnostik in der molekularen Zytogenetik**

Im Weiteren wurde sowohl die cenM-FISH- als auch die cenM54-FISH und die AcroCenM-FISH- Methode auf Patientengut angewandt. Aus der Humangenetik Jena standen hierfür 10 Fälle für die cenM-FISH zur Verfügung, welche im Folgenden näher besprochen werden. Der cenM54-FISH- und der AcroCenM-FISH-Mix wurden an je einem Fall getestet. Zunächst erfolgte die Hybridisierung mit dem cenM(54)- bzw. Acro- Mix, um das Ergebnis im Anschluss mittels Einfarbhybridisierung zu überprüfen. Hierzu wurden im Wesentlichen Sonden von der Firma Vysis verwendet. Bei manchen Fällen war es auch notwendig, mittels Ganzchromosomen- (WCP) oder Teilchromosomensonden (PCP) zu überprüfen, ob euchromatisches Material vorhanden war, um Rückschlüsse auf die klinische Relevanz ziehen zu können.

### 4.3.1 Fälle mit kleinen Markerchromosomen

Tab. 4.4: Übersicht aller für diese Arbeit verwendeten Fälle mit den Ergebnissen der Zytogenetik, der M-FISH und der CenM-FISH.

Fall Nr.	Zytogenetik	M-FISH	cenM-FISH
<b>Pränatalfälle:</b>			
1	47,XX,+mar[16]/46,XX[7]	Kein Ergebnis	der(8)(p11→q11)
2	47,XX,+der(21;21)(q10;q10)	Kein Ergebnis	inv dup(21)(q11)
3	47,XY,+mar[43]/46,XY[7]	der(8)	r(8)(p11q12)
4	47,XY,+mar[5]/46,XY[5]	Kein Ergebnis	inv dup(14)(q11)
5	mos 48,XX,+2mar[16]/46,XX[4]	Kein Ergebnis	2 inv dup(15) (pter→q11.1::p11.1 or q11.1→p13)
<b>Postnatalfälle:</b>			
6	47,XX,+mar	der (1)	+der(1)(p?12→q12)
<b>Tumorzytogenetische Fälle:</b>			
7	47,XY,+mar[20]	Kein Ergebnis	+r(11)
8	Hyperdiploid mit HSR- Marker		6-fache Zentromer-1-Amplifikation
9	Hyperdiploid mit HSR- Marker		3-fache Zentromer-17-Amplifikation
10	Hyperdiploid mit HSR- Marker		4- und 6-fache Zentromer-12-Amplifikation

#### 4.3.1.1 Pränatal

##### Fall Nr.1:

In diesem Fall war vor Einsatz der cenM-FISH- Technik das Ergebnis durch sukzessive Hybridisierung aller Zentromersonden bereits bekannt.

In der cenM-FISH zeigte das SMC ebenfalls deutliche Signale für das Zentromer 8. Mittels Hybridisierung einer WCP- Sonde und der PCP- Sonden 8p und 8q färbte sich der Marker nur sehr schwach an. Dies könnte auf eine unvollständige Unterdrückung der repetitiven Sequenzen durch Cot- 1- DNA zurückzuführen sein. Hieraus und aufgrund der Tatsache, dass die Zentromersonde den ganzen Marker

anfärbt, kann man schließen, dass der Marker zu 95% oder mehr aus heterochromatischem Material besteht. Im Interphase- FISH zeigte sich der Marker in 54% der Kerne.

### Karyotyp nach FISH:

47,XX,+mar. ish der (8)(wcp8-,D8Z2+) oder 47,XX, +der(8)(p11→q11)

Die hier gezeigten Ergebnisse sind im Detail publiziert durch Starke et al., 1999.

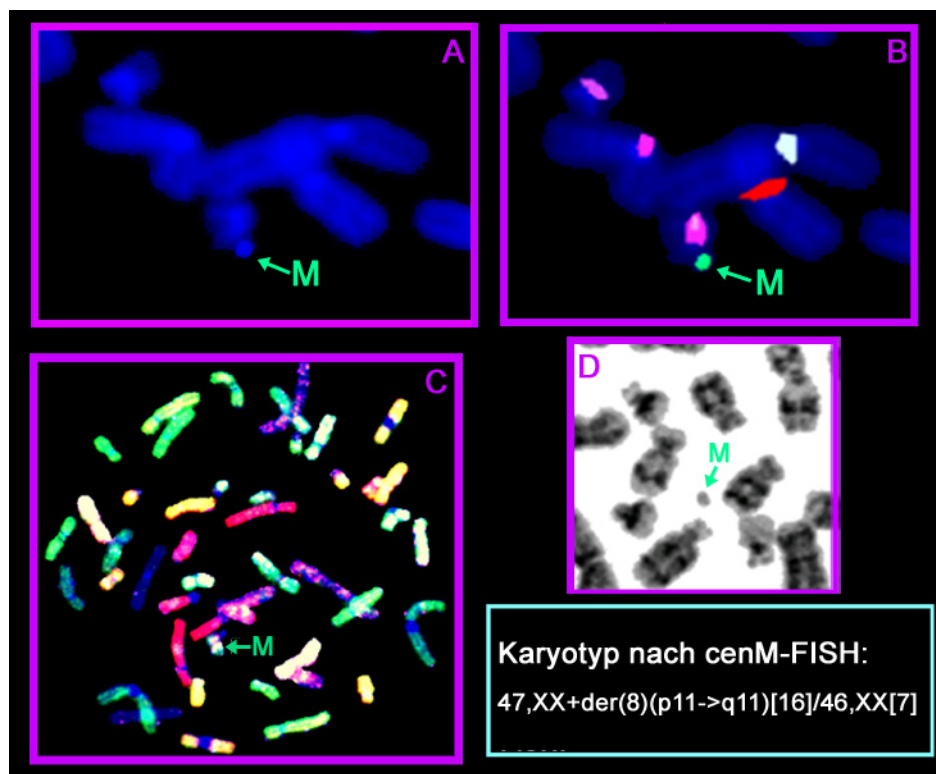


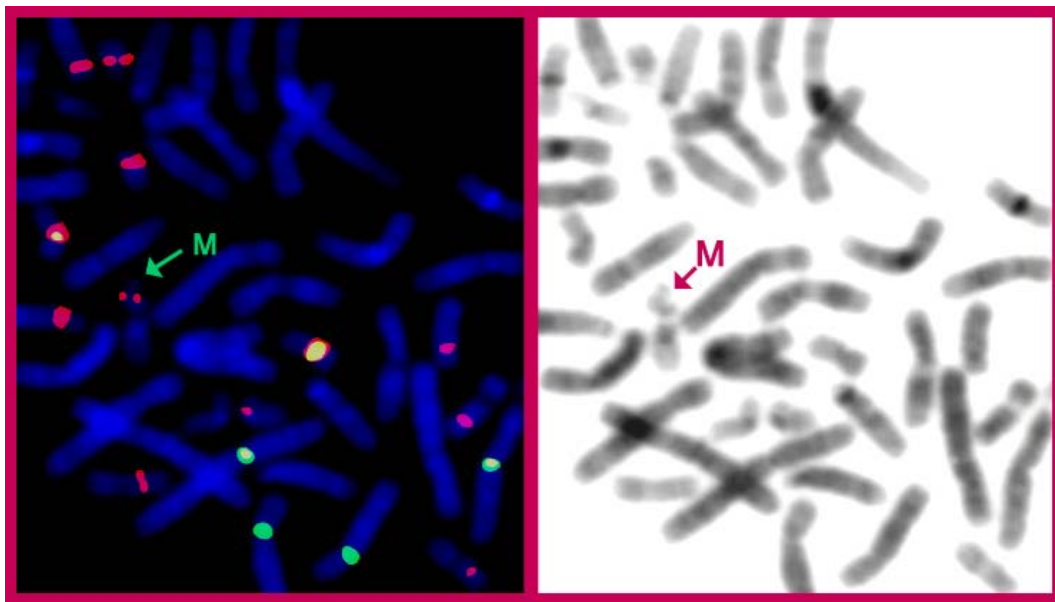
Abb. 4.7: Fall Nr. 1. (A) Ausschnitt aus einer Metaphase (DAPI) mit SMC (M). (B) Die gleiche Metaphase nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH-Mix. Das SMC zeigte die Farbkombination für Zentromer 8. (C) Das SMC (M) nach Hybridisierung mit dem M-FISH- Mix. Das SMC konnte mit der M-FISH nicht charakterisiert werden. (D) Das SMC (M) in der GTG- Bänderung. Auch hier war keine Identifikation möglich.

### Fall Nr.2:

Nach Hybridisierung aller menschlichen Zentromere färbte sich das SMC deutlich mit der für Zentromer 13 und 21- spezifischen Sonde an. In weiteren Hybridisierungen mit den Sonden Wcp 13 und Wcp 21 konnte das Material eindeutig Chromosom 21 zugeordnet werden. Der für das Down- Syndrom verantwortliche Bereich 21q22 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (LSI21- Sonde, Vysis).

Chromosomenanalysen im Blut der Eltern zeigten, dass die Mutter den gleichen Marker wie das werdende Kind trägt. Aufgrund der molekularzytogenetischen Befunde und der fehlenden klinischen Besonderheiten ist davon auszugehen, dass der Marker wenn nur sehr geringe Anteile an euchromatischem Material aufweist, welche sehr wahrscheinlich keine klinische Relevanz besitzen. Das Ergebnis der GTG- Bänderung wurde weitgehend bestätigt.

**Karyotyp nach FISH:** 47,XX, +inv dup(21)(q11)



**Abb. 4.8:** Fall Nr. 2. Ausschnitt aus einer Metaphase mit SMC (M) nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH- Mix (links) und konvertiertes DAPI- Bild (rechts). Das SMC zeigte die Farbkombination für Zentromer 21. Es sind nur 3 Farbkanäle dargestellt.

### **Fall Nr.3:**

In der cenM-FISH zeigte der Marker eindeutige Signale für das Zentromer 8. Mit der im Folgenden eingesetzten wcp8- Sonde färbte sich praktisch der gesamte Marker an, ebenso mit der 8p- spezifischen Sonde, während die 8q- spezifische Sonde keine Signale zeigte. Im kultivierten Fruchtwasser lag das zusätzliche kleine Chromosom in 37% der Zellen vor während es im unkultivierten Fruchtwasser in 40 von 50 Interphasekernen, also in 80% gefunden wurde.

Bei der Chromosomenanalyse im Blut der Mutter konnte der gleiche Marker wie beim Kind nachgewiesen werden. Hierbei stellte sich heraus, dass 71% der Marker monozentrisch waren, während 8% dizentrische Ringchromosomen waren.

Zur Zeit der Untersuchung war der Verlauf der Schwangerschaft (20.SSW) unauffällig.

**Karyotyp nach FISH:** 47,XY,+r(8)(p11;q12)/46,XY

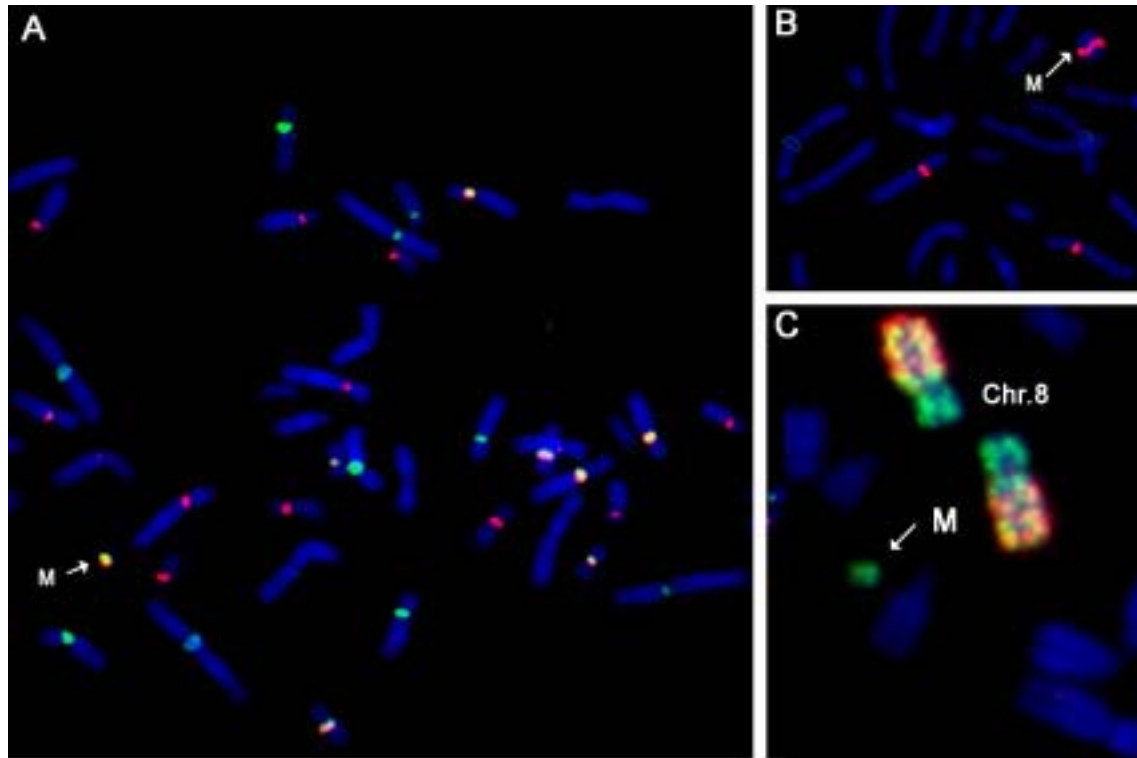


Abb. 4.9: Fall Nr. 3. (A) Ausschnitt aus einer Metaphase mit SMC (M) nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH- Mix. Das SMC zeigte die Farbkombination für Zentromer 8. (B) Dizentrisches Ringchromosom der Mutter (M) nach Hybridisierung mit der spezifischen Zentromersonde für Chromsomal 8 von Vysis. (C) Hybridisierung des SMC (M) mit der WCP 8 (grün)- und PCP 8q (rot)- Sonde. Das SMC zeigt nur ein Signal mit der WCP 8-Sonde, weshalb davon auszugehen ist, dass sich das SMC aus Anteilen des kurzen Arms zusammensetzt.

#### **Fall Nr.4:**

In der cenM-FISH zeigte das SMC zwei eng benachbarte Signale des Zentromer 14. Aufgrund der Tatsache, dass zwischen den Zentromeren keine ungefärbte Lücke erkennbar war und es sich um einen „bisatellited Marker“ handelt, wurde der **Karyotyp** wie folgt beschrieben: 47,XY,+inv dup(14)(q11).

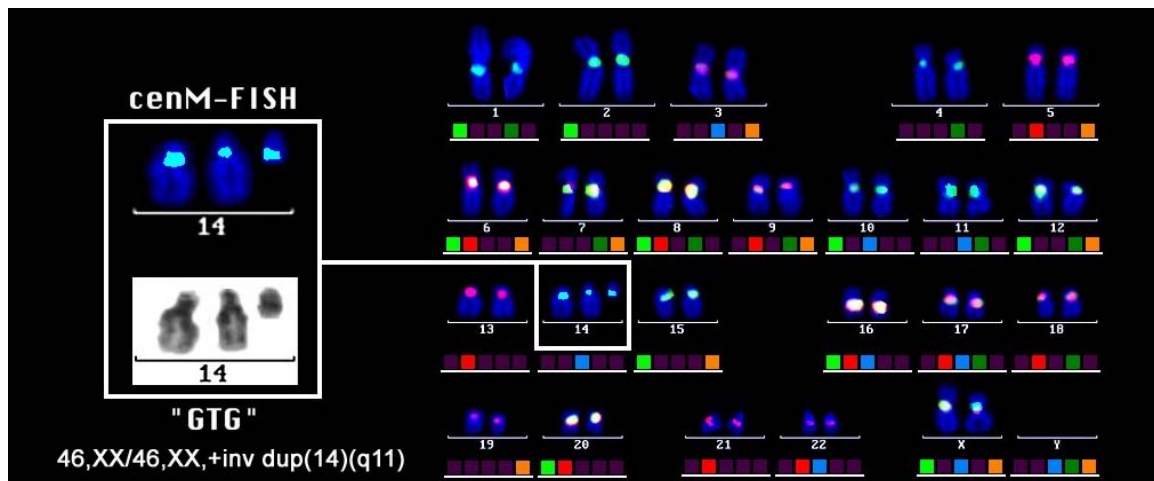


Abb. 4.10: Fall Nr. 4. Karyotyp mit SMC nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH- Mix.

Der Ausschnitt auf der linken Seite zeigt beide normale Chromosomen 14 und das SMC 14.

#### Fall Nr.5:

Nach Hybridisierung mit allen menschlichen Zentromeren konnte gezeigt werden, dass der Marker aus Material von Chromosom 15 besteht. Hybridisierung mit der für die p- Arme der akrozentrischen Chromosomen spezifischen Sonde Midi54 zeigte, dass beide Markerchromosomen je 2 Signale aufweisen.

#### **Karyotyp nach FISH:**

48,XX,+2 inv dup(15)(pter→q11.1::p11.1 or q11.1→p13)[16]/46,XX[4]

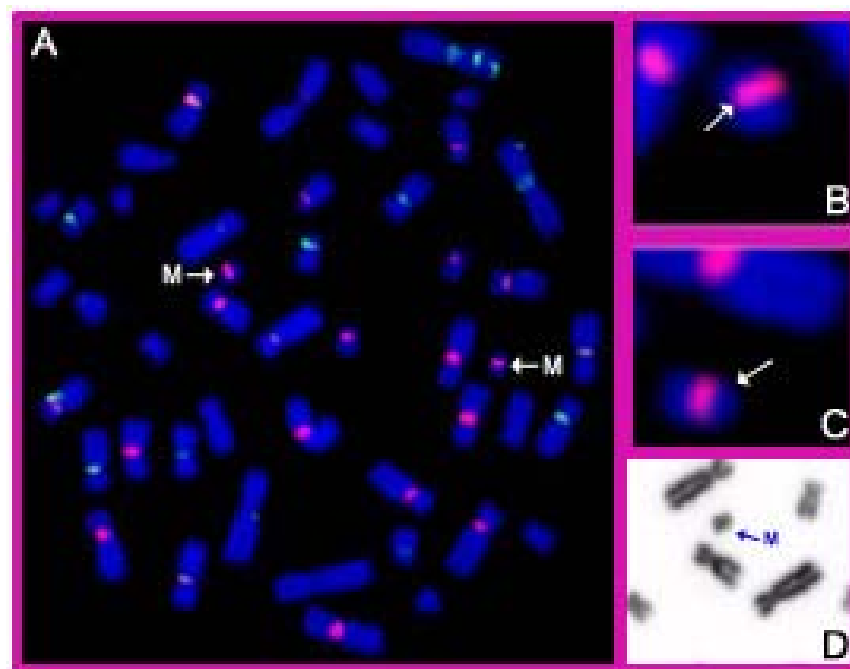


Abb. 4.11: Fall Nr. 5. (A) Darstellung einer Metaphase mit 2 SMC (M) nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH- Mix. Beide SMC zeigten die Farbkombination für Zentromer 15. Es sind nur 3 Farbkanäle dargestellt. (B) und (C) Beide SMC (M) in Vergrößerung. (D) Eines der beiden SMC (M) im invertierten DAPI.

#### 4.3.1.2 Postnatal

##### Fall Nr.6:

Sowohl die Hybridisierung mit allen menschlichen Zentromeren als auch die M-FISH zeigten, dass es sich um Material des Chromosoms 1 handelt. Außer dem Zentromerbereich wies der Marker auch euchromatisches Material des p- und q-Arms auf.

**Karyotyp nach FISH:** 47,XX,+der(1)(p?12→q12)

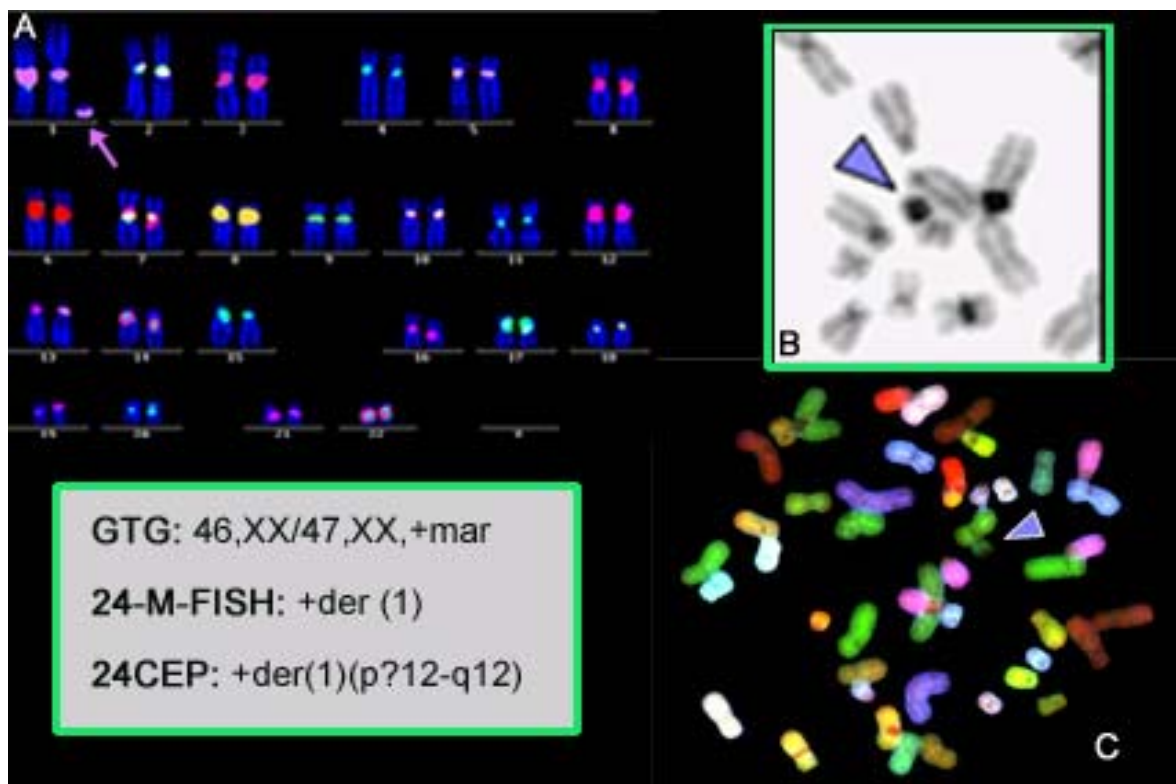


Abb. 4.12: Fall Nr. 6. (A) Karyotyp mit SMC (Pfeil) nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH-Mix. Das SMC zeigte die Farbkombination für Zentromer 1. (B) Das SMC (Pfeil) im invertierten DAPI- Bild. (C) Das SMC (Pfeil) in der M- FISH. Auch hier konnte Material von Chromosom 1 nachgewiesen werden.



#### 4.3.1.3 Tumor

##### Fall Nr.7:

Die Hybridisierung der Knochenmarkszellen mit allen 24 Zentromeren bestätigte die Herkunft des Markers von Chromosom 11. Zusätzlich zeigte es sich, dass es sich um ein Ringchromosom handelte, das in 28 von 30 Metaphaseplatten monozentrisch, in 2 von 30 jedoch dizentrisch war. (Publiziert durch Starke et al., 2001)

Karyotyp nach FISH: 47,XY,+r(11)

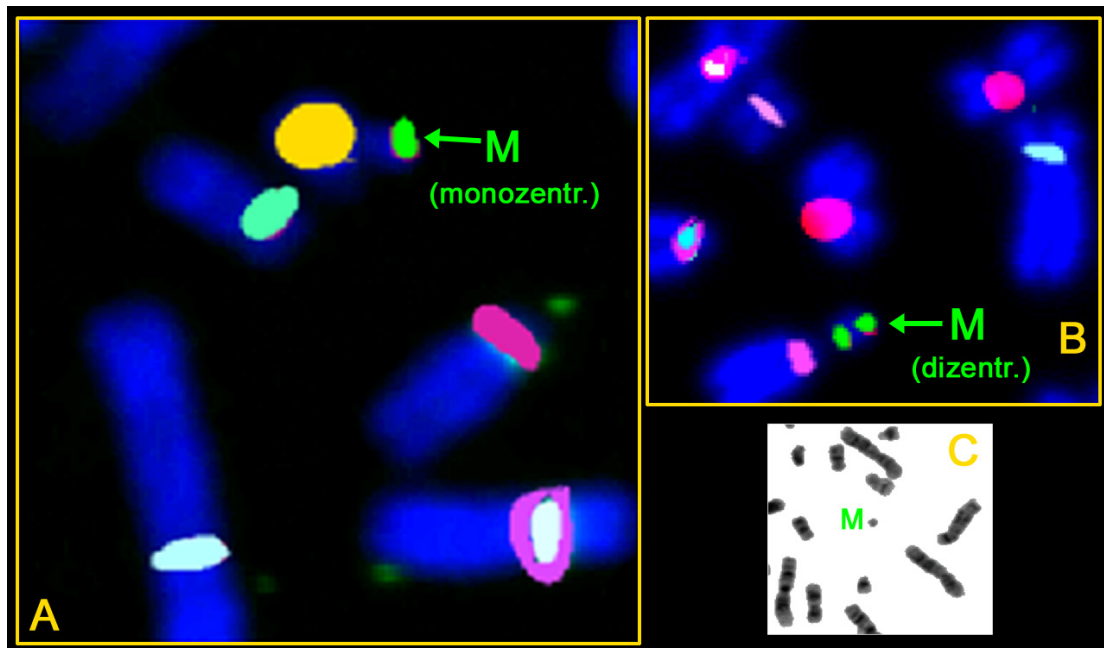


Abb. 4.13: Fall Nr. 7. (A) Ausschnitt aus einer Metaphase mit monozentrischem Ringchromosom (M) nach cenM-FISH. Das Ringchromosom zeigte die Farbkombination für Zentromer 11. Aufgrund der Übersicht wurden Falschfarben zugeordnet. (B) Ausschnitt aus einer Metaphase mit dizentrischem Ringchromosom (M) nach cenM-FISH. Auch beinhaltet das SMC Material von Zentromer 11. (C) Das SMC (M) im invertierten DAPI.



#### 4.3.2 Fälle mit HSR- Markern

##### Fall Nr.8:

Der Marker konnte mittels cenM-FISH Chromosom 1 zugeordnet werden. Eine anschließende Hybridisierung mit der kommerziell erhältlichen Zentromersonde D1Z5 (Vysis), der Pcp 1q und 1p Sonde zeigte, dass das Chromosom ausschließlich aus Material von Chromosom 1 besteht.

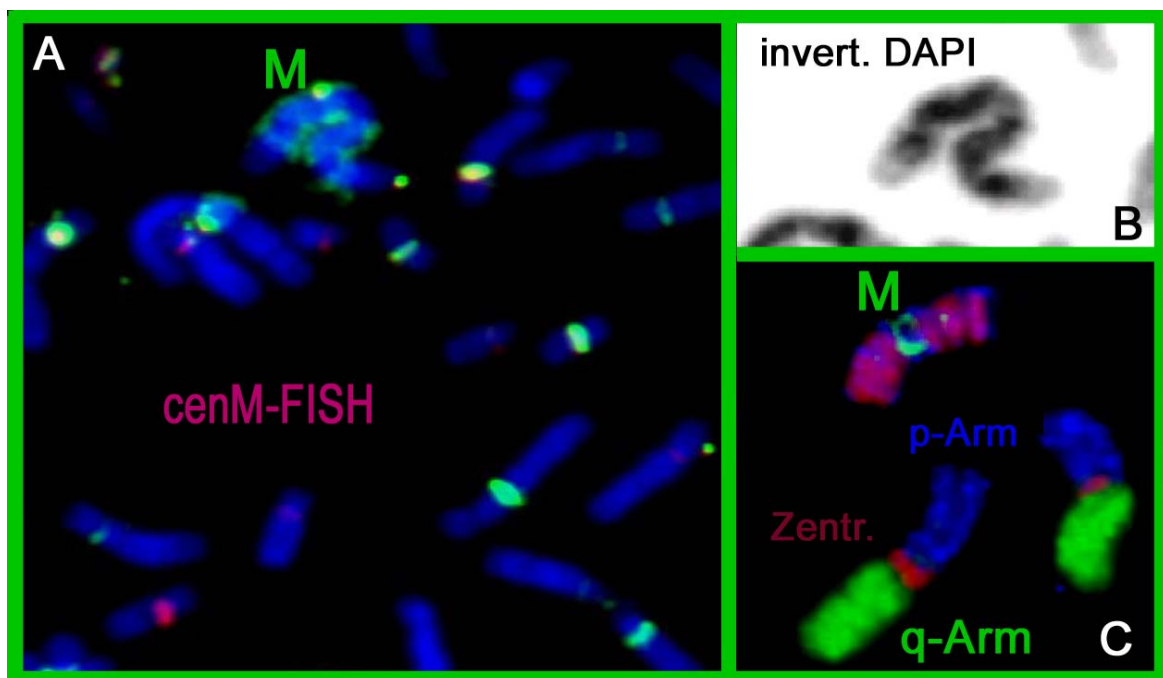


Abb. 4.14: Fall Nr. 8. (A) Ausschnitt aus einer Metaphase mit HSR- Marker (M) nach cenM-FISH. Der Marker zeigt die Farbkombination der Sonde 1q12. Es sind nur 3 Farbkanäle dargestellt. (B) Der HSR- Marker im invertierten DAPI. (C) Beide normale Chromosomen 1 und der HSR-Marker (M) nach Hybridisierung mit der Zentromer-1-spezifischen Sonde D1Z5 von Vysis (rot), der q-Arm- spezifischen Chromosom-1- Sonde (blau) sowie der q-Arm- spezifischen Chromosom-1-Sonde (grün).

Bei den nächsten beiden Fällen handelt es sich um Osteosarkom- Zelllinien, die mir freundlicherweise von Thomas Liehr zur Verfügung gestellt wurden (Publiziert durch Liehr, 1997):

##### Fall Nr.9: (Osteosarkom- Zelllinie RH 30, beschrieben in Oliner et al., 1992)

Nach Hybridisierung mit dem Zentromer- Mix konnten die dreifache Zentromer- 17- Amplifikation bestätigt werden.

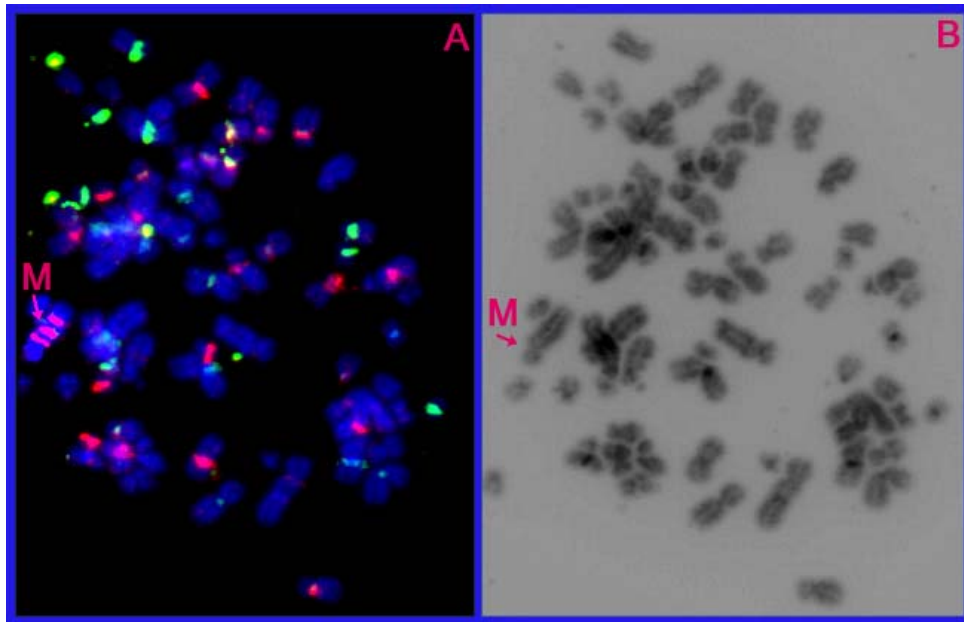


Abb. 4.15: Fall Nr. 9. (A) Metaphase mit HSR- Marker (M) nach cenM-FISH. Der Marker zeigt 3 Signale mit der Farbkombination für Zentromer 17. (B) Gleiche Metaphase im invertierten DAPI.

**Fall Nr.10:** (Osteosarkom- Zelllinie SA 1, beschrieben in Oliner et al., 1992)

Auch hier wurden die in den Vorarbeiten gefundene 6-und 4-fache Amplifikation des Zentromer 12 mittels cenM-FISH bestätigt.

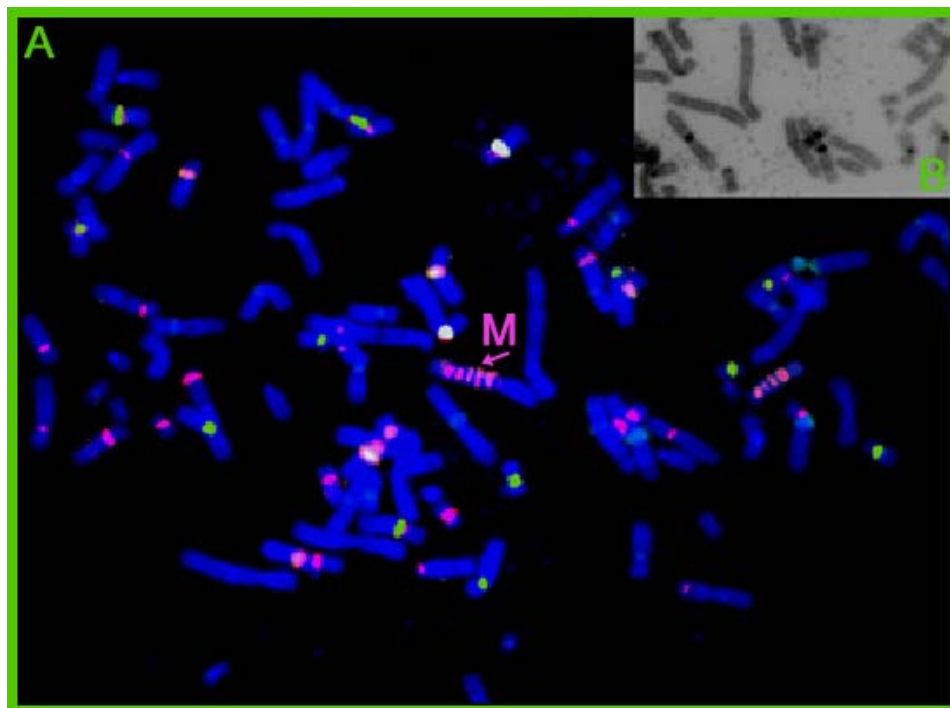
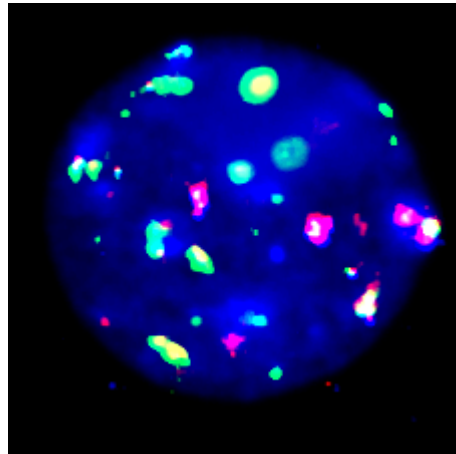


Abb. 4.16: Fall Nr. 10. (A) Metaphase mit HSR- Marker (M) nach cenM-FISH. Der marker zeigt 5 Signale mit der Farbkombination für Zentromer 12. Es sind nur 3 Farbkanäle dargestellt. (B) Ausschnitt aus dieser Metaphasse mit HSR-Marker im invertierten DAPI.

#### 4.4 CenM-FISH in der Interphase

Ohne dreidimensionale Darstellung ist die Auswertung einer cenM-FISH im Interphasekern aufgrund von Überlagerungen und Projektion der Signale in verschiedene Ebenen nicht möglich (s. Abb. 4.17). Hierzu wäre eine dreidimensionale Darstellung notwendig.



**Abb. 4.17:** Interphasekern nach Hybridisierung mit dem cenM-FISH-Mix. Eine Auswertung der Signale ist aufgrund der Überlagerung (die Signale liegen in verschiedenen Ebenen) nicht möglich. Hierzu wäre eine dreidimensionale Darstellung notwendig.

Da eine dreidimensionale Darstellung am Institut für Humangenetik aufgrund fehlender Technik derzeit noch nicht möglich ist, entstand die Idee für die Interphasediagnostik zunächst Kombinationen von 5 bzw. 7 Zentromeren zu etablieren. So war eine sichere Unterscheidung der einzelnen Zentromere möglich. Während bei den 5er-Kombinationen jede Farbe nur einmal belegt ist, wurde bei den 7er-Kombinationen ein Zentromer mit maximal 3 Farben belegt (s. Tab. 4.5 und 4.6).

**Tab. 4.5:** Auflistung der einzelnen 5er-Zentromerkombinationen für die Interphasediagnostik. cen = Zentromer

Kombination Nr.	Cy5	DEAC	SG	SR	SO
1	cen1	cen2/20	cen7	cen8	cen17
2	cen6	cen10	cen12	cen16	cen14/22
3	cen5/19	cen4	cen3	cen13/21	cenX
4	cen18	cenY	cen11	cen15	cen9

Tab. 4.6: Auflistung der einzelnen 7er- Zentromerkombinationen für die Interphase-  
diagnostik. cen = Zentromer

Kombination Nr. 1			
cen	SG	SO	SR
1			
2/20			
7			
8			
12			
16			
17			

Kombination Nr. 2			
cen	SG	SO	SR
5/19			
10			
13/21			
14/22			
X			
Y			

Kombination Nr. 3			
cen	SG	SO	SR
3			
4			
6			
9			
11			
15			
18			

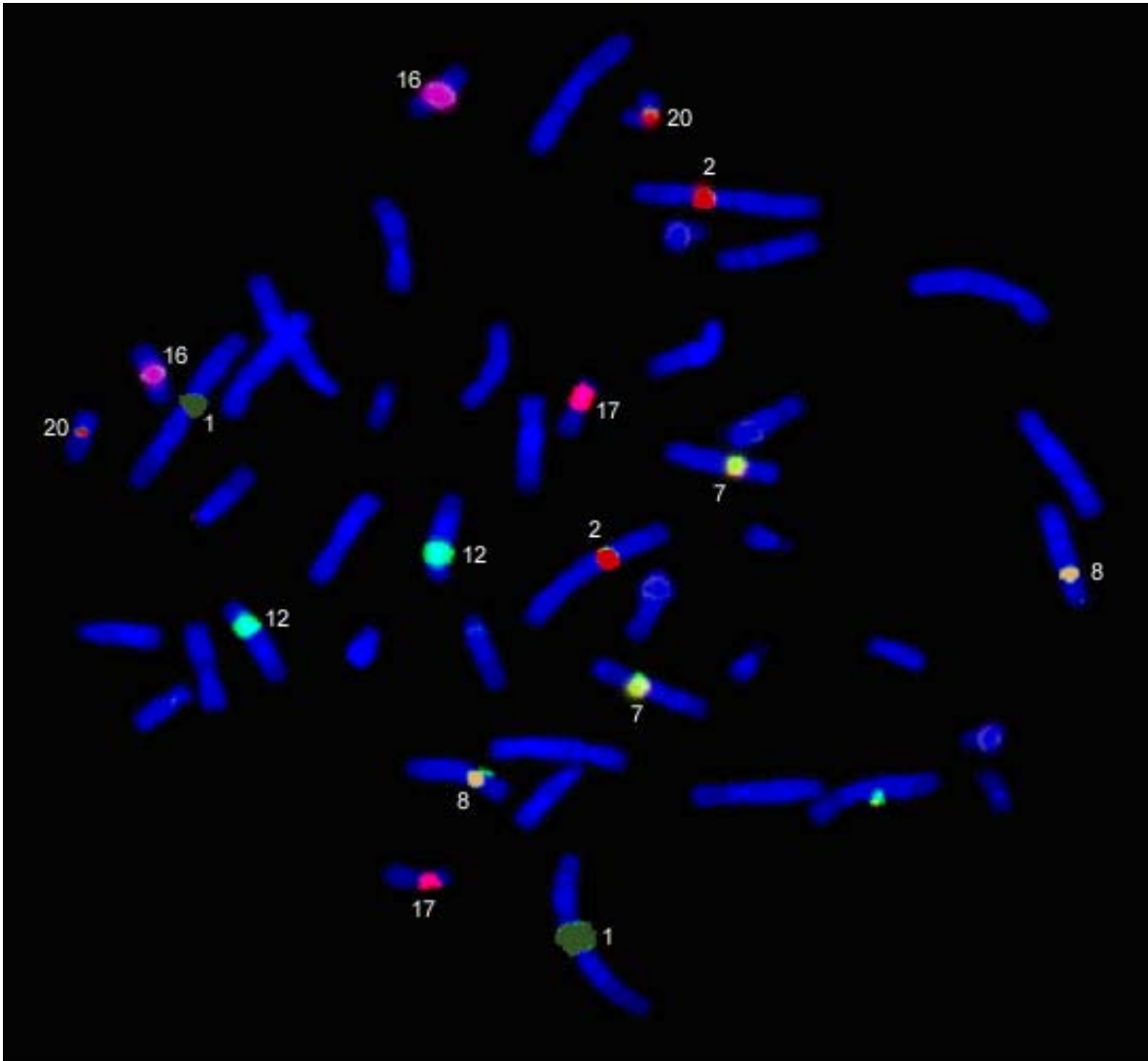


Abb. 4.18: Metaphase nach Hybridisierung von Nr. 1 der 7er- Kombination für die Interphasediagnostik (s. Tab.4.5). Den einzelnen Zentromeren wurden nachträglich Falschfarben zugeordnet.

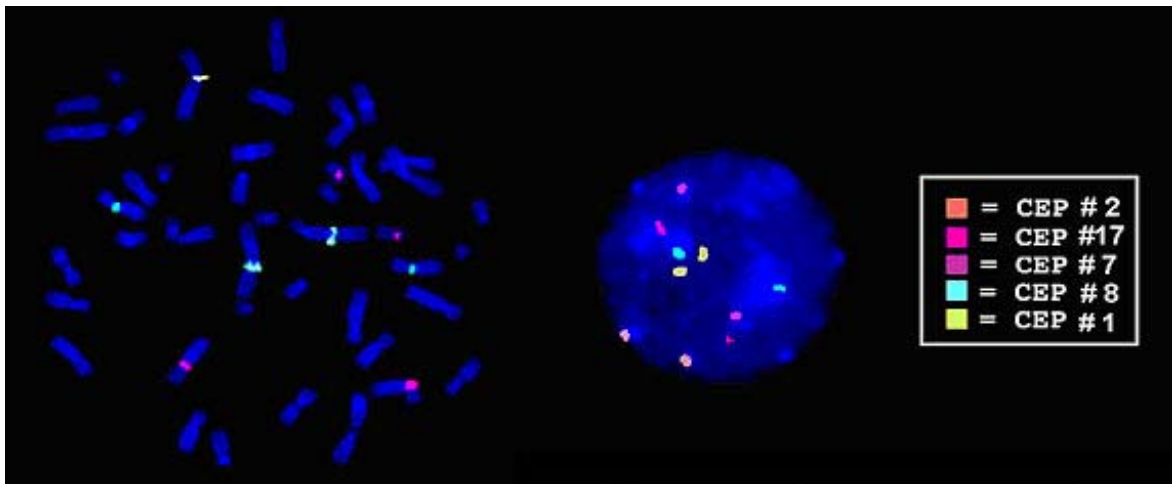


Abb. 4.19: Metaphase und Interphase nach Hybridisierung von Nr. 1 der 5er- Kombination für die Interphasediagnostik (s. Tab.4.4). CEP = Zentromer

## 5 Diskussion

### 5.1 Anmerkungen zur Methodik

#### 5.1.1 Amplifikation der DNA-Sonden

Da der cenM-FISH- Mix für die Routinediagnostik etabliert wurde, sollte die benötigte Sonden- DNA einfach amplifiziert und markiert werden können. Im Gegensatz zur Nicktranslation ist der Einbau von Fluoreszenz-markierten Nukleotiden bei der hier angewandten DOP- PCR effektiver und die gesamte Prozedur der Vervielfältigung und Markierung von DNA weniger zeitaufwendig. Der Nachteil ist allerdings, dass eine Quantifizierung der DOP- PCR- Produkte eher schwierig ist. Außerdem ist es kaum nachvollziehbar, ob die Amplifikation der DNA- Sequenzen wirklich zufällig ist, oder ob nicht doch bestimmte Sequenzen bevorzugt amplifiziert werden. Pich et al. beschrieben 1994, dass die durch die DOP- PCR erhaltenen Produkte sowohl für kurze Sequenzen, als auch für hochrepetitive Sequenzen repräsentativ seien. Stattdessen fanden Cheung and Nelson 1996, dass dies bei der Amplifikation genomischer Sequenzen nicht der Fall ist. Sie gehen davon aus, dass hochrepetitive Sequenzen überpräsentiert sind.

Letztlich erwies sich eine Kombination aus DOP- PCR und Nicktranslation zur Markierung der Sonden als praktikabel und effektiv.

Die zur Hybridisierung eingesetzte Sonden- Konzentration beeinflusst das Ergebnis stark. Als für alphanische Sequenzen optimale Mengen werden in der Literatur ca. 20- 30ng pro ½ OT und Zentromer angegeben (Henegariu et al., 2001). Die Quantifizierung der eingesetzten DNA- Konzentration stellte sich als schwierig heraus, da nach der DOP- PCR das Vorhandensein von Primerkomplexen und die eingebauten Fluoreszenzmoleküle die Messung verfälschten. So erwies es sich am praktikabelsten, die benötigte Konzentration über die in der FISH erhaltenen Signalintensitäten zu ermitteln.

#### 5.1.2 Zentromere mit gleichen oder ähnlichen alphoiden Subfamilien

Einige alphanische Subfamilien weisen die Besonderheit auf, dass sie auf zwei oder mehr verschiedenen Chromosomen vertreten sind (s.1.2.2.2.1). So hybridisieren die Sonden D2Z1 auf den Chr. 2 und 20, D4Z1 auf den Chr. 4 und 9, D13/21Z1

auf den Chr.13 und 21, D14/22Z1 auf den Chr. 14 und 22 und D1Z7 auf den Chr.1/5/19 (Willard and Waye, 1987; Choo, 1997; Archidiacono et al., 1995; Jorgensen, 1997; Lee et al., 1997).

Interessanterweise waren nach Amplifikation und Hybridisierung der Sonde D1Z7 mit Hilfe der DOP- PCR nur Signale auf Chr. 5 und 19 sichtbar. Es ist anzunehmen, dass das Signal auf Chr. 1 so schwach war (vermutlich durch den Einsatz von Cot- 1- DNA), dass es nicht mehr erkennbar war. Eine sichere Unterscheidung zwischen Chromosom 5 und 19 erfolgte durch den Einsatz einer Mikrodissektionssonde aus der Humangenetik. Diese Sonde stammt von einem kleinen Markerchromosom, das Bereiche des Zentromers von Chromosom 5 und 6 abdeckt. Das Problem der Differenzierung zwischen Chromosom 2 und 20 konnte mit Hilfe einer Chromosom- 20- spezifischen Sonde behoben werden. Ebenso musste zur Sonde D14Z9 (spezifisch für Chr. 14 und 22) eine Chromosom- 22- spezifische- Sonde (D20Z2) und zur Sonde D4Z1 die Chromosom- 9- spezifische Sonde D9Z4 eingesetzt werden. Nur die sichere Unterscheidung von Chromosom 13 und 21 ist nicht möglich, da die alphoiden Subfamilien im Bereich beider Zentromere zu 99,7% identisch sind (Maratou et al., 1999).

### 5.1.3 Der Einsatz von Cot- 1- DNA

Landegent et al. beschrieben 1987 erstmals die Verwendung von Cot- 1- DNA zur Unterdrückung repetitiver Sequenzen bei der Hybridisierung genomischer DNA. Bei der Hybridisierung von Zentromersequenzen ist es normalerweise nicht üblich, Cot- 1- DNA einzusetzen, da diese bevorzugt an alphoiden Sequenzen (hier v.a. an den Zentromer 1, 3, 9, 13, 14, 15, 16, 19, 21, 22, Y) bindet (Wang et al., 1995). Jedoch war in dieser Arbeit eine geringe Menge notwendig, um unerwünschte Kreuzhybridisierungen zu unterdrücken. Die Menge (2µg/ Ansatz) beträgt jedoch nur in etwa 1/20 der für die M- FISH üblichen Menge. Auch wurde die Prähybridisierungszeit, in der die Cot- 1- DNA die Möglichkeit hat, an die Sonden- DNA zu binden, von 30 auf 10 min herabgesetzt.

In einer ähnlichen Arbeit (s. 5.2) wird für den CM-FISH (Henegariu et al., 2001) keine COT- 1- DNA verwendet, aber auch hier wird beschrieben, dass zur Reduktion von Kreuzhybridisierungen statt der Plasmidsonden spezifischere Oligonukleotidsonden (Warburton, 1991) von Vorteil sein können.

## 5.2 Klinische Relevanz der etablierten Techniken

Die Variabilität in der Ausprägung des Phänotyps bei Patienten mit einem kleinen Markerchromosom ist sehr groß. Sie reicht von (anscheinend) normalem Phänotyp bis zu schweren Dysmorphien mit schwerer mentaler Retardierung (Crolla, 1998). Um in der pränatalen Beratung wenigstens annähernd eine Vorhersage für den Phänotyp treffen zu können, ist es wichtig, die Herkunft des genetischen Materials möglichst genau zu charakterisieren. Noch bis vor einigen Jahren war dies aufgrund der einleitend genannten technischen Limitierungen nur sehr eingeschränkt möglich. Demzufolge existieren nur wenige und häufig ungenaue Daten für eine Vorhersage in Bezug auf den Phänotyp und damit für eine verlässliche Beratung. Inzwischen gibt es viele neue Möglichkeiten, wie zum Beispiel Einzelsonden, Bestimmung der Bruchpunkte mittels kartierter BACs und YACs oder Mikrosatellitenanalysen (für Übersicht s. Liehr and Claussen, 2002a+b), die in Zukunft letztlich eine genetische Beratung erleichtern werden.

Nach Literaturangaben liegt die Inzidenz für Markerchromosomen bei 0,14- 0,72/1000 Feten (Jacobs et al., 1974; Hamerton et al., 1975; Nielsen and Rasmussen, 1975; Sachs et al., 1987; Nielsen and Wohler, 1991).

Kleine zusätzliche Markerchromosomen wurden bisher für alle menschlichen Chromosomen beschrieben (Crolla, 1998; Stankiewicz et al., 2000). Etwa 80- 86% aller Marker stammen von akrozentrischen Chromosomen (Warburton, 1991; Buckton et al., 1985; Blennow et al., 1994), 40- 62% haben ihren Ursprung im Chromosom 15 (Blennow et al., 1994, Crolla et al., 1995).

Auffällig ist eine große Variabilität der klinischen Ausprägung bei Patienten mit kleinen Markerchromosomen, die vom gleichen Chromosom stammen. Dies ist das Ergebnis unterschiedlicher Größe, des variablen Gehalts an genetischem Material, sowie der unterschiedlichen Ausprägung eines Mosaiks. Auch eine Uniparentale Disomie der normalen Homologen des Chromosoms, von dem der Marker stammt, kann von Bedeutung sein (Chudoba et al., 1999; Röthlisberger et al., 2001; von Eggeling et al., 2002).

Mit den vor Anfertigung der vorliegenden Arbeit verfügbaren Methoden waren kleine Markerchromosomen bisher oft gar nicht oder nur schwer charakterisierbar. Die Bänderungszytogenetik (Caspersson et al., 1968) ist schon per Definition



nicht aussagekräftig (s. Einleitung) und auch eine Charakterisierung mittels M-FISH (Speicher et al., 1996), SKY (Schröck et al., 1996) oder COBRA (Tanke et al., 1999) ist nur möglich, wenn ausreichend euchromatisches Material auf dem SMC vorhanden ist. Zwar kann umgekehrt durch diese Verfahren eine Beteiligung von euchromatischem Material weitgehend ausgeschlossen werden, die Herkunft des Markers ist damit aber nicht geklärt. Abgesehen davon ist eine Diagnose, welche auf ein Fehlen eines Signals basiert, immer problematisch, da auch ein nicht aussagekräftiges Hybridisierungsergebnis als Ursache in Betracht gezogen werden muss (Uhrig et al., 1999). Die Mikrosezierung eines Markers (Viersbach et al., 1994) führt zwar mit großer Wahrscheinlichkeit zum Ergebnis, ist aber sehr zeitaufwendig und kann auch nur in wenigen Labors in Deutschland durchgeführt werden. Sukzessive Einzelhybridisierung aller verfügbaren oder die Kombination von maximal 8 verschiedenen Zentromer-spezifischen Sonden war bisher in vielen Labors die einzige Möglichkeit, SMC zu charakterisieren (z.B. Plattner et al., 1993a; Ulmer et al., 1997; Starke et al., 1999; Li et al., 2000). Dieses Verfahren ist jedoch ebenfalls sehr zeitaufwendig, teuer und benötigt große Mengen an Zellmaterial, welches vor allem bei der Diagnostik von Fruchtwasserzellen oder Trophoblasten häufig nicht zur Verfügung steht.

Aus diesem Grund bot es sich an, ein Verfahren (cenM-FISH) zu entwickeln, das alle obengenannten Probleme berücksichtigt und eine einfache Lösung anbietet. Durch die cenM-FISH-Technik ist der Aufwand zur Charakterisierung eines SMC relativ gering, die Kosten sind vergleichsweise niedrig und die Technik ist einfach zu handhaben. Ein weiterer Vorteil ist, dass sogar GTG-gebänderte OT genutzt werden können. So können Marker, die in der Bänderungszytogenetik gefunden werden und häufig nur in einer Metaphase vorhanden sind, nachträglich mittels cenM-FISH identifiziert werden. Die begrenzte Menge an zu untersuchendem Material ist v.a. in der Pränataldiagnostik ein häufig auftretendes Problem. 7 von 8 der präsentierten Fälle (2 der 10 Fälle waren Zelllinien) wiesen zudem ein Mosaik im Karyotyp auf. Dies reduzierte die Menge der informativen Metaphasen zusätzlich auf 10- 80%. Für die cenM-FISH reichte in einigen Fällen zur Identifizierung eine Metaphase mit SMC aus, mit anschließender Überprüfung bzw. Bestätigung des Ergebnisses mittels Interphase-FISH.

Von den hier vorgestellten 10 Fällen weisen lediglich drei einen akrozentrischen Marker und nur einer zwei vom Chromosom 15 stammende Marker auf. Dies ist

darauf zurückzuführen, dass die Fälle vorselektioniert waren. Die meisten Fälle bekamen wir von anderen Einrichtungen zugeschickt. Da das Chromosom 15 sehr häufig involviert ist, wird dieses zumeist zuerst ausgeschlossen. Akrozentrische Marker sind als solche bereits in der NOR- Färbung sichtbar. Folglich reicht zur Klärung der Herkunft des SMC die Überprüfung weniger Zentromere aus. Aus diesem Grund werden zumeist nur Fälle mit Markern zugeschickt, die in anderen Labors nicht identifiziert werden konnten.

Inzwischen sind mehr als 50 Fälle mit SMC am Institut für Humangenetik Jena charakterisiert worden. Darunter befanden sich auch viele akrozentrische SMC. Zur schnelleren und einfacheren Charakterisierung dieser Marker, wurde in der vorliegenden Arbeit die cenM54-FISH und die AcroCenM-FISH etabliert (siehe 5.2.2).

### 5.2.1 cenM-FISH

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es keine der cenM-FISH entsprechende Methode. Eine analoge Technik zur cenM-FISH (Nietzel et al., 1999, Nietzel et al., 2001), die CM-FISH wurde später bzw. parallel zu dem hier vorgestellten Verfahren entwickelt und veröffentlicht (Henegariu et al., 2001).

Im Unterschied zu dem hier gezeigten Vorgehen wurden bei der Centromeric Multiplex-FISH (CM-FISH) alle Sonden mit Nicktranslation markiert. Die Kombination von Farbstoffen (Nederlof et al., 1989) wurde mit dem Ratio- Labelling (Tanke et al., 1999) verbunden, so dass pro Zentromer maximal 2 Farbstoffe verwendet wurden. Hierzu ist jedoch eine spezielle Soft- und Hardware notwendig, die in der Humangenetik Jena nicht zur Verfügung stand.

Im Gegensatz zu der von Henegariu et al. 2001 etablierten CM-FISH verwendeten wir für das Chromosom 1 eine Heterochromatinsonde (1q12) statt der Zentromersonde, da diese uns nicht unmarkiert zur Verfügung stand. Außerdem wurde zur Unterscheidung von Zentromer 5 und 19 eine Mikrosezierungssonde eingesetzt. Diese bindet auf den Zentromeren 5 und 6, während in der CM-FISH die Sonde pC1.8, spezifisch für das Zentromer 5, zum Einsatz kam. Die sichere Unterscheidung von Zentromer 13 und 21 ist weder mit Hilfe der cenM-FISH noch der CM-FISH möglich (s. oben).

Die praktische Anwendbarkeit und Relevanz der cenM-FISH- Technik wurde in der vorliegenden Arbeit an 10 Fällen mit kleinen zusätzlichen Markerchromosomen ohne, bzw. mit wenig Euchromatin demonstriert. Sowohl in der Pränatal- und Postnataldiagnostik als auch der Tumorzytogenetik, erwies sich die Technik als praktikabel (siehe 5.2.1).

Zunächst wurden 6 Fälle (Fall Nr. 1, 2, 6, 7, 9, 10) untersucht, bei denen das Ergebnis bereits durch andere Verfahren ermittelt worden war. Die anderen Fälle wurden zunächst mit dem cenM-FISH- Mix hybridisiert, um anschließend das Ergebnis mittels Ein- Farb- FISH unter Verwendung von käuflichen Sonden zu bestätigen.

#### 5.2.1.1 Fälle mit partieller Trisomie 8

Zwei der analysierten Marker zeigten Signale mit Zentromer 8 (Fall 1 und 3).

In **Fall Nr 1.** konnte kein euchromatisches Material, jedoch ein Mosaik pränatal nachgewiesen werden. In der Literatur sind bisher zwei Fälle mit solch einem winzigen Markerchromosom mit Zentromer material 8 beschrieben worden, wobei beide allerdings erst postnatal diagnostiziert worden waren. In beiden Fällen entsprach die Klinik einer Mosaik- Trisomie 8 (Spinner et al., 1995; Sasagawa et al., 1995). Im vorliegenden Fall Nr. 1 zeigte das Kind abgesehen von einem leicht erweiterten Ureter im Ultraschall keinerlei Auffälligkeiten (Starke et al., 1999). Alle anderen bisher beschriebenen Fälle mit Markern stammend von Chromosom 8, waren Ringchromosomen (Plattner et al., 1993b; Melnyk and Dewald, 1994; Daniel et al., 1994; Blennow et al., 1993; Butler et al., 1995; Hastings et al., 1999), submetazentrische Chromosomen (Ohashi et al., 1994; Rothenmund et al., 1997) oder Marker mit substantiellen euchromatischen Anteilen, ohne nähere Angaben zur chromosomalen Morphologie des Markers (Gravholt and Friedrich, 1995; Schröck et al., 1997). Der Fall Nr.1 wurde von Starke et al. 1999 publiziert.

Auch der Marker in **Fall Nr. 3** stammt von Chromosom 8. Er zeigte sich in 37% der kultivierten und 80% der unkultivierten Fruchtwasserzellen. Hier ist euchromatisches Material des p- Arms beteiligt. Eine den Bereich 8p22- pter abdeckende Sonde zeigte kein Signal auf dem Marker, so dass der trisome Bereich auf 8p11→p21.3 eingegrenzt werden konnte.

Bei einer Chromosomenanalyse der elterlichen Lymphozyten stellte sich heraus, dass die Mutter des Kindes Trägerin des gleichen Markers war.

Hier fand sich der Marker in 100% der untersuchten Metaphasen. Davon waren 70% monozentrisch, während 30% dizentrisch waren und als Ringchromosomen vorlagen (s.5.2.1.5).

In der Literatur sind viele partielle Trisomie 8 Fälle beschrieben (Walker and Bo-cian, 1987; Melnyk and Dewald, 1994; Spinner et al., 1995; Butler et al., 1995). Die Klinik stimmt in den meisten Fällen mit der einer Mosaik- Trisomie 8 überein (Skelett-, Haut und Gesichtsanomalien, milde bis starke mentale Retardierung; Rothenmund et al., 1997; Walker et al., 1987). Die Marker sind allerdings häufig nicht genau charakterisiert. Rethoré et al. beschrieben 1977 einen Fall mit Trisomie 8p11→ p22. Phänotypisch zeigten sich Gesichts- und Extremitätendysmorphien.

Ein ähnlicher Fall mit dup (8) (p21.1→p21.1) zeigte klinische Auffälligkeiten, die einer Duplikation des distalen Bereichs des kurzen Armes von Chromosom 8 entsprechen (Borghgraef and Fryns, 1987). Aus diesem Grund ist eventuell davon auszugehen, dass die Bruchpunktbestimmung nicht korrekt war (Schinzel, 2001). Batanian et al., 2000 beschrieben 2 Fälle mit SMC 8, bei denen nur Anteile des kurzen Arms involviert waren. In beiden Fällen bestanden Dysmorphien und mentale Retardierung. Wie schon oben erwähnt (Fall Nr.1) wurden auch kleine Ringchromosomen, vom Chromosom 8 abstammend, in der Literatur beschrieben (Plattner et al., 1993a; Blennow et al., 1993; Daniel et. al.; 1994, Melnyk and Dewald, 1994; Butler et al., 1995; Hastings et al., 1999). In allen Fällen sind klinische Auffälligkeiten geschildert worden, allerdings fehlt zumeist eine genauere Charakterisierung des euchromatischen Materials.

Im vorliegenden Fall war die Ultraschalluntersuchung in der 20. SSW unauffällig, weitere klinische Daten liegen uns nicht vor. Da die Mutter allerdings in 100% der Metaphasen den gleichen Marker aufweist und phänotypisch unauffällig ist, ist davon auszugehen, dass auch das Kind keine Auffälligkeiten zeigen wird (s. 1.2.1). Sicherheit besteht bei dieser Annahme jedoch nicht.

#### **5.2.1.2 Akrozentrische Marker**

Drei der untersuchten Fälle wiesen akrozentrische, sogenannte ‚bisatellited marker‘ (s.1.2.2) auf. Solche Marker sind in der Literatur vielfach erwähnt. In einer Untersuchung von 20`370 Fruchtwasserproben wurden 1567 ‚bisatellited marker‘ (0,064%) gefunden (Djalali, 1990). Bei Crolla et al., 1995 und 1998 wiesen etwa

55% aller von akrozentrischen Chromosomen stammenden Marker 2 Satelliten auf. Ca. 60% aller Fälle mit akrozentrischen SMC waren phänotypisch unauffällig, während ca. 40% der Fälle Dysmorphien und/oder leichte bis schwere mentale Retardierungen zeigten.

**Im Fall Nr.5** handelte es sich um 2 von Chromosom 15 abstammende ‚bisatellited marker‘. Da die Prader- Willi- (PWS)/ Angelman- Syndrom (AS)- Sonde 15q11-q13 auf beiden Markern kein Signal zeigte, ist davon aufzugehen, dass es sich um eine Hexasomie 15p handelt.

Invertierte Duplikationen des kurzen Armes von Chromosom 15 sind in der Literatur mehrfach beschrieben worden (Wisniewski et al., 1979; Buckton et al., 1985; Mohandas et al., 1985; Crolla et al., 1995; Kaluzewski et al., 2001). 57% aller kleinen Markerchromosomen werden als inv dup(15) klassifiziert (Blennow et al., 1994). Zumeist sind sie ‚bisatellited‘, pseudodizentrisch und haben ihren Bruchpunkt in der Region 15q11- q14. Webb unterteilte kleine inv dup(15) Marker in 3 Gruppen, wobei Marker, wie in Fall Nr.5, bei denen nur ein Zentromer sichtbar ist, zur Gruppe 1 zählen (Webb, 1994). Hier wird davon ausgegangen, dass nur die Region 15pter- q11 involviert ist. Patienten mit Markern aus dieser Gruppe können klinisch unauffällig sein (Stetten et al., 1981; Wisniewski and Doherty, 1985; Buckton et al., 1985; Maraschio et al., 1988; Callen et al., 1992, Crolla et al., 1995). Einige Patienten zeigten Auffälligkeiten eines PWS, wobei hier eine UPD der beiden Chromosomen 15 nicht ausgeschlossen wurde (Ridler et al., 1971; Fujita et al., 1980; Wisniewski et al., 1980; Mattei et al., 1983). Dysmorphien wurden nur selten beschrieben (Buckton et al., 1985). Weiterhin traten Epilepsie (Bataglia et al., 1997, Borgatti et al., 2001), Autismus (Rineer et al., 1998), sowie gynäkologische Auffälligkeiten (Crolla et al., 1995; Grosso et al., 2001) im Zusammenhang mit einem inv dup(15) Marker auf.

Ein Fall mit 2 identischen Markern (Manenti, 1992) wie im hier genannten Fall und ein weiterer Fall mit 2 Markern inv dup (15) (pter→q11.2::q11.2→pter) (Martin-Lucas et al., 1986) sind in der Literatur beschrieben. In beiden Fällen handelte es sich um Männer mit einer Oligoasthenospermie bei ansonsten unauffälligem Phänotyp. Maraschio et al. beschrieben 1988 zwei Fälle mit einer Trisomie 15p. Auch hier waren Männer betroffen, wobei nur einer von beiden infertil war. Ein phänotypisch unauffälliger Mann mit einem Marker inv dup (15) und einem winzigen SMC

15 wurde bei Tung et al., 2001 erwähnt. Ein Fall mit zwei ähnlichen Markern bei einem weiblichen Genotyp wurde in der Literatur wohl bisher noch nicht beschrieben.

Auch SMC von Chromosom 14 stammend, wie in **Fall Nr. 4**, sind relativ häufig. In vielen Publikationen konnte allerdings zwischen Zentromer 14 und 22 nicht unterschieden werden (Crolla, 1998; Plattner et al., 1993b, Calabrese et al., 1994; Daniel et al., 1994; Hastings et al., 1999), so dass die genaue Häufigkeit von SMC 14 noch unklar ist. In der Literatur sind bisher mindestens 33 SMC 14 beschrieben (Fryns et al., 1974; Crolla, 1998; Viersbach et al., 1998, Kaluzewski et al., 2001). Bei Crolla, 1998 waren 10 von 18 klassifizierten SMC 14 ‚bisatellited‘, wovon 7 keine und nur 3 Fälle eine geringe phänotypische Abweichung aufwiesen. Zumeist sind die in der Literatur beschriebenen Marker allerdings nicht genau charakterisiert, so dass ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. 4 Fälle mit einem derivativen Chromosom 14 [der (14) (pter→p10::p10→pter)], wie in **Fall Nr. 4**, wurden von Viersbach et al., 1998 beschrieben. Hier wiesen alle einen normalen Phänotyp auf. Auch bei Thangavelu et al., 1994 wurden 2 Fälle mit einem SMC 14 ohne Anteile des langen Arms bei normalem Phänotyp erwähnt.

**Fall Nr. 2** zeigte ein von Chromosom 21 abstammenden Marker mit einem Zentromer und Satelliten an beiden p- Armen. Die für das Down- Syndrom verantwortliche Region 21q22 konnte nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass es sich um folgenden Karyotyp handelt: 47,XX,+der(21;21)(p10;p10).

Da eine spezifische Sonde für das Zentromer 21 nicht existiert, ist die molekularzytogenetische Unterscheidung von Markern, die von Chromosom 13 oder 21 abstammen nur möglich, wenn euchromatisches Material vorhanden ist. In der Literatur findet man deshalb häufig keine Unterscheidung, womit ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist (Gravholt and Friedrich, 1995; Plattner et al., 1993a; Viersbach et al. 1994; Daniel et al., 1994; Brondum- Nielsen and Mikkelsen, 1995, Blennow et al., 1995; Crolla et al., 1998). Allerdings wird beschrieben, dass Marker, die von Chromosom 13 oder 21 abstammen, ein relativ geringes Risiko einer phänotypischen Abweichung tragen, sofern die Down- Syndrom- spezifische Region 21q22 nicht dupliziert ist (Callen et al., 1992, Blennow et al., 1995).

In der Literatur sind 4 ‚bisatellited marker‘ 13/21 ohne euchromatisches Material beschrieben (Plattner et al., 1993b; Brondum-Nielsen et al., 1995; Kaluzewski et al., 2001). Der klinische Phänotyp war unauffällig bis auf leichte Schädeldysmorphien in einem der drei Fälle. Bei einem weiteren Fall (Viersbach et al., 1994) zeigten 2 kleine Marker nach Mikrosezierung und ‚revers painting‘ nur Signale auf den Zentromeren 13 und 21, sowie den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen. Beide Marker waren NOR- negativ. Hier werden keine Angaben zur Klinik gemacht.

Zur Klinik in dem hier genannten Fall liegen uns keine Daten vor, allerdings wurde die zytogenetische Untersuchung aufgrund einer habituellen Abortneigung und Zustand nach Gravidität mit Robertson’scher Translokation durchgeführt. Die untersuchte AFP- Konzentration im Fruchtwasser lag im Normbereich. Da die Mutter Trägerin des gleichen Markers ist, ist davon auszugehen, dass auch das Kind einen normalen Phänotyp zeigen wird (s. 1.2.1).

### 5.2.1.3 Sonstige Fälle

Im Fall Nr. 6 handelt es sich um ein vom Chromosom 1 stammenden Marker mit wahrscheinlich zentromernahen euchromatischen Anteilen des p- und q- Armes. Marker von Chromosom 1 abstammend sind in der Literatur bisher in ca. 15 Fällen beschrieben. In 13 von 15 Fällen stellten sich diese Marker als Ringchromosomen dar (Michalski et al., 1993; Lanphaer et al. 1995; Röthlisberger et al. 2001; Callen et al., 1999, Chen et al., 1995, Plattner et al., 1993b; Xu et al., 1998; Giardino et al., 1999, Shanske et al., 1999). In 2 Fällen ist ein derivatives Chromosom ohne euchromatisches Material bei normalem Phänotyp beschrieben (Crolla et al., 1998; Li et al., 2000). Besteht der Marker nur aus Zentromerbereich bzw. heterochromatischem Material, scheint dies keine Auswirkungen auf den Phänotyp zu haben (Michalski et al., 1993, Plattner et al., 1993b; Li et al., 2000; Crolla et al., 1998). In 4 Fällen ist sowohl Material des kurzen als auch des langen Armes involviert (Lanphaer et al., 1995; Röthlisberger et al., 2001; Callen et al., 1999; Xu et al., 1998). Geringfügige Gesichts- und Extremitätendysmorphien bestanden in allen Fällen, wobei nur in einem Fall eine mentale Retardierung auftrat (Lanphaer et al., 1995).

Der hier vorgestellte Marker zeigte sich nicht als Ringchromosom, wobei eine Telomeruntersuchung nicht erfolgt war. Eine Beteiligung innerer Organe wurde in

keinem der oben genannten Fälle beschrieben, mit Ausnahme eines Ventrikelseptumdefekts (Callen et al., 1999). Gehirn-, Herz-, Nieren- sowie Darmfehlbildungen wurden bei partiellen Duplikationen des langen Armes von Chromosom 1 beschrieben (Watson et al., 1990; Furforo et al., 1996; De Silva et al., 1998; Germain- Lee et al. 1990, Chen et al., 1994), so dass davon auszugehen ist, dass euchromatisches Material des q-Armes bei der Zusammensetzung des SMC beteiligt ist.

#### **5.2.1.4 Fälle aus der Tumorzytogenetik**

Vier Fälle aus der Tumorzytogenetik wurden mittels cenM-FISH untersucht. Davon setzten sich drei der untersuchten Marker aus sogenannten ‚Homogeneously Staining Regions‘ (HSR) (s.unten) zusammen.

Im **Fall Nr. 7** handelt es sich um ein im Knochenmark eines CML- Patienten gefundenes Ringchromosom. In der Literatur wurde ein solches kleines, von Chromosom 11 abstammendes SMC bei einer PH- negativen CML bisher nicht beschrieben. Auch Veränderungen des langen Arms des Chromosom 11 bei CML findet man selten. Eine Beteiligung der Bande 11q13 in komplexen Ph- Translokationen wurde durch Koduru et al. 1993 beschrieben. Deletionen in 11q14 findet man in etwa 7% aller Myelodysplastischen Syndrome (MDS) (Ronney and Czepulkowski, 1994). Es ist jedoch nicht sicher, ob solche Markerchromosomen bisher nicht öfter beschrieben wurden, weil sie sehr selten sind, gefundene Marker nicht klassifiziert werden können, oder sie aufgrund schlechter Qualität der Metaphaseplatten in der Tumorzytogenetik oft gar nicht entdeckt werden. Der Fall wurde durch Starke et al., 2001 publiziert.

#### **Fälle mit Homogeneously Staining Regions (HSR)**

Die Genamplifikation ist ein Mechanismus der Onkogenaktivierung. Zytogenetisch zeigt sich diese Amplifizierung als kleines autonomes Chromosom (double minute chromosome [dmin]) oder als ‚Homogeneously Staining Region‘ (HSR) (Benner et al., 1991, Arranz et al., 1996). Solche HSR oder dmin findet man v.a. in soliden, aber auch hämatologischen Tumoren (Benner et al., 1991, Arranz et al., 1996). In einer Studie von 125 menschlichen Tumoren fand man in 17 Fällen HSRs (Benner et al., 1991). In der Literatur beschrieben wurde eine Assoziation zu weit fortge-



schrrittenen neoplastischen Transformationen (Alitalo et al., 1986; Slamon et al., 1987) sowie eine Bedeutung in der Entstehung von Medikamentenresistenzen (Benner et al., 1991; Slovac'93). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass diese Sequenzen in grundlegenden Zellfunktionen eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung des transformierten Phänotyps spielen (Schwab et al., 1983).

Die Amplifikation von Satellitensequenzen wurde zunächst hauptsächlich für tierische Chromosomen erwähnt (Heartlein et al., 1988, Haaf et al., 1992, Warburton and Cooke, 1997) und ist bisher in nur 15 Fällen für menschliche Chromosomen in Tumoren beschrieben. Hier handelte es sich um die Amplifikation von alphoiden Sequenzen des Chromosoms 12 in zwei lipomatösen Tumoren und einer Osteosarkom- Zelllinie (Gisselsson et al., 1999a; Sirvent et al., 2000) bzw. 4 Osteosarkomen (Gisselsson et al., 1998), sowie in zwei Fällen um eine Amplifikation der Alpha- Satelliten- DNA, spezifisch für die Chromosomen 13 und 21 bei Patienten mit AML (Fonatsch et al., 2001). Ein Liposarkom- Fall mit Amplifikation von Alpha- Satelliten- Sequenzen des Chromosoms 8 auf einem von Chromosom 5 stammenden derivativen Chromosom wurde bei Sirvent et al. 2000 beschrieben. Weitere Zentromeramplifikationen wurden in drei verschiedenen soliden Tumoren und zwei AML aufgezeigt (Gisselsson et al., 1999a). Auch in Osteosarkomen werden Zentromeramplifikationen beschrieben, jedoch beruhen diese Angaben auf Interphaseauswertungen, so dass keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob die Amplifikation innerhalb eines Chromosoms oder nur innerhalb der Zelle stattgefunden hat (Murata et al., 1998; Gisselsson et al., 2002). Es ist möglich, dass diese Zentromeramplifikationen zu Falschdeutungen bezüglich der Aneuploidie in einer Zelle führen. In weiteren Publikationen über Osteosarkome bzw. HSR wurde die Zentromerregion nicht untersucht (z.B. Muleris et al., 1994; Forus et al., 1995; Szymanska et al., 1996), so dass man eventuell davon ausgehen kann, dass solche Zentromeramplifikationen häufiger sind, als bisher beschrieben. Die Bedeutung solcher Satellitensequenz- Amplifikationen ist noch weitgehend unklar. Entsprechende Untersuchungen bei Tieren zeigten Hinweise auf eine gestörte mitotische Funktion (Heartlein et al., 1988; Haaf et al., 1992; Warburton and Cooke'97). Frühere Studien haben bereits gezeigt, dass die Rekombination von menschlicher Alpha- Satelliten- DNA zur Amplifikation angrenzender DNA führen kann (Heartlein et al., 1988; van't Veer et al., 1993). Denkbar wäre auch eine Kopplung der

Amplifikation von Satelliten- DNA an die Coamplifikation bzw. Aktivierung von Onkogenen.

Teilamplifikationen des Chromosoms 12 bei Osteosarkomen wie in der hier beschriebenen Osteosarkomzelllinie SA1 (**Fall Nr. 10**) sind in der Literatur sehr häufig beschrieben. Hier ist vor allem die Region 12q13-15 involviert, in der unter anderem das Gen MDM2 lokalisiert ist, welches für die Inaktivierung von TP53 verantwortlich gemacht wird. (Ladanyi et al., 1993 ; Oliner et al., 1992 ; Khatib et al., 1993 ; Pedeutour et al., 1994; Kools and van de Ven, 1996; Szymanska et al., 1996; Bridge et al., 1997; Gisselsson et al., 1998; Wei et al., 1999; Gamberi et al., 2000; Gisselsson et al., 2002). Die Amplifikation von Alpha- Satelliten- DNA des Chromosoms 12 wurde bisher in 4 Osteosarkomen (Gisselsson et al., 1998) und einer Osteosarkomzelllinie (Gisselsson et al., 1999a) beschrieben.

Die Amplifikation von Alpha- Satelliten- DNA des Chromosoms 17 in Osteosarkomen wurde bisher nur für die hier beschriebenen Osteosarkomzelllinie RH30 (**Fall Nr. 9**) publiziert (Liehr et al., 1997). Auch ist ein Verlust von Chromosom- 17- Material für diese Tumoren eher typisch als ein Zugewinn (Mertens et al., 1993; Hoogerwerf et al., 1994; Fletcher et al., 1994; Forus et al., 1995; López- Ginés et al., 1996; Bridge et al., 1997). Die **Fälle Nr. 9 und 10** wurden 1997 durch Liehr et al. publiziert.

Eine Amplifikation der Region 1q21 wie in **Fall Nr. 8** wird bei malignen Tumoren häufig beobachtet (Muleris et al., 1994; Forus et al., 1998; Zhang et al., 1999). Häufig ist die Beteiligung dieser Region in chromosomalen Rearrangements auch in Lymphomen. Le Baccon et al., 2001 beschrieb die Duplikation dieser Region in 4 von 17 Fällen mit NHL. Es wird spekuliert, dass die bevorzugte Beteiligung dieser Region auf die Präsenz von repetitiven Sequenzen und/ oder eine geringere Reparaturhäufigkeit in dieser Region zurückzuführen ist (Cook and Hindley, 1979; Surralles et al., 1997). Des Weiteren ist es möglich, dass Rearrangements in dieser Region Gendosis- Veränderungen hervorrufen, die Onkogene oder Tumorsuppressorgene betreffen und/ oder eine Deregulation von pathologisch wichtigen Genen im 1q12 Heterochromatin bewirken (Le Baccon et al., 2001).

### 5.2.1.5 Fälle mit Ringchromosomen

Markerchromosomen variieren in Größe und Morphologie stark. Häufig sind sie dizentrisch und/ oder ringförmig. Bisher sind in der Literatur relativ wenig Ringchromosomen charakterisiert. Es wird davon ausgegangen, dass Träger von Ringchromosomen ein hohes Risiko für phänotypische Abweichungen aufweisen (Daniel et al., 1994, Crolla et al., 1998). Aus diesem Grund ist es wichtig, als Ringchromosomen gekennzeichnete Markerchromosomen genau zu charakterisieren und weitere Korrelationen zu klinische Daten herzustellen.

Zusätzliche Ringchromosomen findet man in etwa 12- 16% (Blennow et al., 1995; Li et al., 2000) aller Fälle mit Markerchromosomen. Häufiger treten sie in malignen Tumoren auf (Mitelman, 1998; Gisselsson et al., 1999b). Allerdings ist es möglich, dass nicht alle Ringchromosomen als solche identifiziert werden, da sie morphologisch nicht immer als solche erkennbar sind. Dazu ist es notwendig, eine Telomersonde einzusetzen. Sind keine Telomere nachweisbar, kann man davon ausgehen, dass es sich um Ringchromosomen handelt (Daniel et al., 1994; Röthlisberger et al., 2001), wobei auch Ringchromosomen mit eingestreuten Telomerasequenzen beschrieben wurden (Gisselsson et al., 1999b). Obwohl der Verlust der terminalen Enden oft von geringer Bedeutung ist, stellt die Ringstruktur häufig ein mechanisches Problem bei der Mitose dar, begleitet von ständigem Wechsel in Größe und Zusammensetzung des Rings (McClintock, 1938; Lejeune, 1968; Hamerton, 1971; Callen et al., 1991; Plattner et al., 1993b, Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology). Sie entstehen häufig *de novo* und werden nur selten an die Nachkommen weitergegeben, da sie zumeist instabil sind. Aus diesem Grund treten sie auch häufig als Mosaik auf. Ringchromosomen als Marker wurden in der Pränataldiagnostik für alle Chromosomen beschrieben, außer für das Chromosom 11 (Crolla et al., 1995 und Crolla, 1998; Hastings et al., 1999, Stankiewicz et al., 2000). Unter den bei Crolla, 1998 aufgelisteten Fällen mit Ringchromosomen zeigten nur ca. 20% einen unauffälligen Phänotyp, während ca. 63% Dysmorphien zeigten und ca. 53% eine leichte bis schwere mentale Retardierung aufwiesen. Ähnliche Daten wurden 1994 von Daniel et al. beschrieben. Zwei der hier vorgestellten Fälle wiesen Ringchromosomen auf. Im **Fall Nr. 3** (s. auch 5.2.1.1) zeigte sich in 8% der Marker der Mutter ein dizentrischer Ring, der jedoch nicht an die Tochter weitergegeben wurde. Normalerweise sind dizentrische Chromosomen sehr instabil, es sei denn, ein Zentromer ist inaktiviert oder

beide Zentromere liegen so nahe beieinander, dass sie wie eines funktionieren (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology). Dies, sowie der Ring als mechanisches Hindernis in der Mitose könnten auch erklären, warum beim Kind nur ein Mosaik des Markers und kein Ringchromosom gefunden wurde. Zusätzliche Ringchromosomen, von Chromosom 8 stammend, wurden in der Literatur mehrfach beschrieben (Daniel et al., 1994; Plattner et al., 1993b; Blennow et al., 1993; Melnyk and Dewald, 1994; Butler et al., 1995, Hastings et al., 1999, Tonk et al., 2000). Alle Fälle zeigten auffällige Phänotypen.

Im **Fall Nr. 7** (s. auch 5.2.1.4) handelte es sich nicht um einen konstitutionellen, sondern im Knochenmark erworbenen zum Teil dizentrischen Ring.

### **5.2.2 Exaktere Charakterisierung von akrozentrischen Markerchromosomen**

Etwa 80- 86% aller Marker stammen von akrozentrischen Chromosomen (Warburton, 1991; Buckton et al., 1985; Blennow et al., 1994), d.h. von den Chromosomen 13, 14, 15, 21 oder 22. Aus diesem Grund entstand die Notwendigkeit einer besseren und schnelleren Charakterisierung dieser Marker. Die zunächst etablierte CenM54-FISH wurde anschließend durch die, für bereits in der Zytogenetik identifizierte akrozentrische Marker besser geeignete AcroCenM-FISH ergänzt.

#### **5.2.2.1 CenM54-FISH**

Zur besseren Charakterisierung der akrozentrischen Marker wurde zusätzlich zu den 23 Zentromersonden eine Mikrodissektionssonde (Midi54) eingesetzt, die alle p- Arme der akrozentrischen Chromosomen abdeckt. Diese Kombination ist vor allem geeignet für dizentrische SMC, die von akrozentrischen Chromosomen stammen und nur einen oder keinen p- Arm aufweisen (z.B. Liehr et al., 1992).

Auch sind in der Literatur Fälle beschrieben, bei denen mehr als ein Marker gefunden wurde, wobei NOR- positive aber auch NOR- negative Marker nebeneinander existierten. Häufiger sind Fälle mit einer Trisomie 21 und einem zusätzlichen Marker (Starke et al., 2003; Plattner et al., 1993b; Hook and Cross, 1987). Seltener sind Fälle mit mehr als 2 Markerchromosomen. Vermeesch et al. beschrieben 1999 einen Fall mit 6 SMC bei einem leicht mental retardierten 47- Jahre alten Mann. Auch hier fanden sich akrozentrische und nicht- akrozentrische Marker nebeneinander. Weitere Fälle mit 3- 7 Markern wurden in der Literatur

beschrieben (Mascarello et al, 1987; Tozzi et al., 1988; Hook and Cross, 1987; Plattner et al., 1993b; Ulmer et al., 1997).

#### 5.2.2.2 AcroCenM-FISH

Akrozentrische Marker lassen sich häufig schon in der Giemsa- Bänderung und NOR- Färbung als solche identifizieren. Die meisten akrozentrische Marker setzen sich aus Zentromer-, Perizentromer- und Satellitenregion zusammen (Langer et al., 2001). Häufig sind es Isochromosomen und/ oder dizentrische Marker. Es wird davon ausgegangen, dass Träger eines akrozentrischen Markerchromosoms eine gute Prognose bezüglich des Phänotyps besitzen, wenn nur parazentrische Regionen und/ oder Satelliten involviert sind (Buckton et al., 1985; Crolla, 1998; Hastings et al., 1999). Zur Charakterisierung solcher Fälle wurde einen Mix zusammengestellt, der alle akrozentrischen Zentromere, sowie die Sonde für die Nukleolus- organisierende Region (NOR) und eine, alle p- Arme abdeckende Sonde (Midi 54) beinhaltet.

In der Literatur wird eine überzufällig häufige Paarung zwischen akrozentrischen Chromosomen und den Geschlechtschromosomen X/Y beschrieben (Stahl et al., 1984). Daraus erklärt sich auch die relativ häufige Einbeziehung dieser Chromosomen bei Translokationen. Hier ist vor allem das Y- Chromosom involviert. Y- Autosomen- Translokationen kommen in 0,5‰ aller Neugeborenen vor (Nielsen and Rasmussen, 1976), wobei die Träger dieser Translokationen zumeist einen normalen Phänotyp besitzen (Nielsen and Rasmussen, 1976, Cohen et al., 1981; Fryns et al., 1985). Solche Translokationen wurden in der Literatur mehrfach beschrieben (Subrt and Blehova, 1974; Turleau et al., 1980; Funderburk et al., 1982; Gabarron et al., 1985; Andersson et al., 1988; Alitalo et al., 1988). In 70% der Fälle ist das Y- Heterochromatin auf den kurzen Arm eines akrozentrischen Chromosoms transloziert, wobei in 52% der Fälle das Chromosom 15 involviert ist (Haaf et al., 1989). Solche Marker werden auch als ‚satellited Y chromosomes‘ (Yqs) bezeichnet (Kühl et al., 2001). Es schien daher sinnvoll, in den Sonden- Mix für den AcroCenM- FISH die Sonde Yq12 zu integrieren. Somit kann dieser Mix nicht nur zur Charakterisierung von kleinen Markerchromosomen eingesetzt werden, sondern ist auch bei der Untersuchung von vergrößerten kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen sinnvoll zu verwenden. Mit seiner Hilfe können ausgeschlossen bzw. detektiert werden: Zentromerpolymorphismen, NOR-Norm-

varianten,  $\beta$ -Satelliten-bedingte Normvarianten der Größe der kurzen Arme (mittels Sonde midi54), Translokation von Yq12- Material, sowie Translokationen von anderem (euchromatischem) Material. Letzteres würde durch keine der verwendeten Sonden angefärbt.

Der Vorteil dieses Verfahrens ist vor allem eine Kosten- und Zeitersparnis, sowie eine größere Übersichtlichkeit.

Aufgrund ähnlicher Überlegungen wurde der sogenannte AcroM-FISH 2001 von Langer et al. publiziert. Hier wurden jedoch Ganzchromosomensonden aller akrozentrischen Chromosomen mit den jeweiligen Zentromeren, sowie einer RNA-Sonde kombiniert. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass eine Unterscheidung von Zentromer 14 und 22 nicht möglich ist und dass eine NOR- Sonde, sowie die Sonde Yq12 nicht integriert wurden. Von den 16 dort untersuchten Fällen mit SMC war es in 5 Fällen nicht möglich, die Herkunft des Markers genau zu bestimmen. In 3 Fällen betraf dies die Chromosomen 13/21, wobei die Unterscheidung auch mit dem AcroCenM-FISH nicht gelingt und in einem Fall die Chromosomen 14/22, da eine Unterscheidung zwischen Zentromer 14 und 22 nicht möglich war. In einem fünften Fall konnte weder mit der AcroM-FISH noch mit der M-FISH die Herkunft bestimmt werden. Hier wäre der Einsatz des cenM-FISH sinnvoll gewesen. Eine Erweiterung dieser Technik durch subzentrische Sonden wird derzeit am Institut für Humangenetik Jena erprobt (s. 6.1).

### 5.3 Kombination von cenM-FISH mit M-FISH

Ein weiteres Anwendungsgebiet könnte die cenM-FISH- Technik in Kombination mit der M-FISH- Technik finden. Bei der gleichzeitigen Hybridisierung aller Ganzchromosomensonden müssen repetitive Sequenzen mit Hilfe von Cot- 1- DNA unterdrückt werden (Chromosomen *in situ* Suppression =CISS), um unspezifische Kreuzhybridisierungen zu verhindern (Lichter et al., 1988). Demzufolge kann auch keine Aussage über die Zentromere getroffen werden. In der Literatur ist ein Marker von Chromosom 5 stammend mit Sequenzen von Chromosom 1 und amplifizierten Alpha- Satelliten- Sequenzen von Chromosom 8 beschrieben (Sirvent et al., 2000). Es ist durchaus möglich, dass ähnliche Konstellationen nur deshalb so

selten beschrieben werden, da Zentromer- und Ganzchromosomensonden bisher zumeist nicht kombiniert eingesetzt wurden.

Mit der Kombination der cenM-FISH Technik und der M-FISH Technik wäre dieses Problem gelöst und man hätte die Möglichkeit, Aussagen darüber zu machen, ob Zentromer und Euchromatin vom gleichen Chromosom stammen bzw., ob dizentrische Chromosomen vorliegen. Erste erfolgversprechende Versuche hierzu wurden bereits durchgeführt. Eine Einschränkung erfuhr dieses Verfahren vor allem durch die Tatsache, dass am Institut für Humangenetik lediglich 6 Fluorochrome erfasst werden können. DAPI eingeschlossen, sind aber 7 Farbkanäle notwendig. Ein weiteres Problem stellen die unterschiedlichen Belichtungszeiten dar. Während Zentromersonden eine Belichtungszeit von weniger als 3 Sekunden haben, benötigen die Ganzchromosomensonden des M-FISH- Mixes Zeiten von 5- 30 Sekunden. Möglicherweise könnte dieses Problem mit Hilfe einer anderen Aufnahmetechnik, z.B. der SKY (Spektral Karyotyping)- Technologie gelöst werden. Diese misst weniger die Intensitäten der vorhandenen Fluorochrome, sondern integriert, welche Fluorochrome an einem Bildpunkt überhaupt vorhanden sind.

#### 5.4 Einschränkungen

Einschränkungen erfahren die obengenannten Techniken, wenn das zu untersuchende Markerchromosom keine oder mittels FISH nicht mehr nachweisbare Mengen an  $\alpha$ - Satelliten- DNA aufweist. Das Fehlen von alphoider DNA im Zentromer ist in der Literatur mehrfach beschrieben worden (s. auch 1.2.2.4) und ist nicht automatisch an die Funktionslosigkeit gekoppelt. In solchen Fällen kann das Zentromer nur mittels molekulargenetischer Methoden nachgewiesen und die Identität des Markerchromosoms mit Hilfe der M-FISH-/ SKY- oder COBRA- Technik, der Mikrosezierung bzw. des Flow- Sorting und anschließender Hybridisierung bestimmt werden. Eine extreme Reduktion der  $\alpha$ - Satelliten- DNA gekoppelt an ein extrem schwaches oder nicht mehr nachweisbares FISH- Signal wurde vor allem für das Zentromer 21 beschrieben (Mizunoe and Young, 1992, Bossuyt et al., 1995, Weier and Gray, 1992; Verma et al., 1992, Lo et al., 1999), aber auch für das Zentromer 22 (Liehr et al., 1998). Marker ohne  $\alpha$ - Satelliten- DNA wurden unter anderem als von den Chromosomen 3, 9, 10, 11, 13, 14 und 15 stammend, beschrieben (Verma and Luke, 1992; Voullaire et al., 1993; Vance et al., 1997;

Wandall et al., 1998; Magnani et al., 1998; Barry et al., 1999; Mackie Ogilvie et al., 2001).

## **5.5 Ausblicke in die Zukunft**

### **5.5.1 subcenM-FISH**

Weitere Möglichkeiten bietet die Kombination des cenM-FISH mit Subzentromerspezifischen Sonden (subcenM-FISH). Vor allem bei sehr geringen Mengen an Euchromatin ist der Nachweis mittels Ganzchromosomsonden oder armspezifischen Sonden oft nicht möglich. Häufig ist auch die Unterdrückung der Zentromerregionen mittels COT-1-DNA nicht ausreichend, so dass eine sichere Abgrenzung zwischen euchromatischen und repetitiven Sequenzen nicht immer gewährleistet ist. Hier wäre es sinnvoll, spezifische Sonden einzusetzen, die die zentromernahen Regionen abdecken. Ein entsprechender Ansatz wurde bereits im Institut für Humangenetik durch Heike Starke etabliert. Erste Ergebnisse zeigen, dass tatsächlich eine Korrelation von minimalen partiellen „zentromernahen Trisomien“ und bestimmten klinischen Auffälligkeiten existiert – z.B. scheinen klinische Auffälligkeiten mit zentromernaher Trisomie 1q, 1p, 2p, 6p, 6q, 7q und 12q assoziiert zu sein, während Zugewinne von 2q, 3p, 7p, 17p und 18p keine klinischen Konsequenzen haben (Quelle: pers. Mitteilung bzw. unveröffentlichte Daten Dr. T. Liehr).

Des Weiteren wäre es sinnvoll den cenM-FISH-Ansatz mit Subzentromersonden für die Chromosomen 13 und 21 zu kombinieren, um so eine bessere Unterscheidung beider Chromosomen zu gewährleisten.

### **5.5.2 UPD- Analysen**

Uniparentale Disomie wird häufig durch eine meiotische Chromosomenverteilungsstörung verursacht, gefolgt von Verlust (Trisomie) oder Verdopplung (Monosomie) eines Chromosoms, um die korrekte Chromosomenzahl wieder herzustellen. Die Folgen solcher Störungen und damit die Vorhersage für den Phänotyp ist sehr komplex, da drei verschiedene Faktoren involviert sind: zum einen können es Folgen einer Trisomie auf die Plazenta bzw. den Fetus sein, aber auch die Aus-



wirkung autosomal rezessive Erkrankungen durch Homozygotisierung oder Genprägungseffekte bestimmter Chromosomen (Ledbetter and Engel, 1995).

UPD wurde bisher für fast alle Chromosomen beschrieben (Morison and Reeve, 1998; Kotzot, et al., 1999). Zunächst gab es Untersuchungen zur UPD hauptsächlich für das Chromosom 15 (Prader- Willi-/ Angelman- Syndrom), aber auch für das Chromosom 11 (Wiedemann- Beckwith- Syndrom) und das Chromosom 7 (Silver- Russel- Syndrom). Erst in letzter Zeit wurden auch für andere Chromosomen vermehrt Untersuchungen bezüglich einer UPD durchgeführt, so dass hier noch wenige Daten für eine verlässliche genetische Beratung vorliegen.

Es wird vermutet, dass Patienten mit SMC ein erhöhtes Risiko für UPD der strukturell normalen Homologen des SMC haben (Crolla et al., 1995; Röthlisberger et al., 2001). Bestätigt sich diese Vermutung, so wird insbesondere die Identifikation von sehr kleinen Markerchromosomen eine zusätzliche Bedeutung erlangen. Denn auch wenn diese auf den Phänotyp keine Auswirkungen haben, da kein euchromatisches Material involviert ist, könnte eine phänotypisch relevante UPD vorliegen.

### **5.5.3 Fast- FISH**

Es ist denkbar, dass die Hybridisierungszeit auf wenige Stunden reduziert werden könnte, wie es in verschiedenen Fast- FISH- Protokollen beschrieben wurde (Durm et al., 1997 und 1998; Banerjee, et al., 1998). Erste Versuche hierzu wurden bereits durchgeführt und es zeigte sich, dass die Signale zwar etwas schwächer, aber dennoch eindeutig waren. Solch ein Schnelltest bietet sich vor allem an, wenn bereits eine weit fortgeschrittene Schwangerschaftsdauer vorliegt.

### **5.5.4 Anwendung der cenM-FISH in der Interphase- FISH**

Repetitive DNA- Sonden sind als klare, deutlich definierte Punktsignale im Interphasekern sichtbar (Klinger et al. 1992, Trask 1988). Die Auswertung der cenM-FISH im Interphasekern ist also theoretisch denkbar. Allerdings wäre hierzu ein Laser- Scanning- Mikroskop zur 3- dimensionalen Darstellung notwendig, da es im herkömmlichen Lichtmikroskop zu Überlagerungen kommt. Auch ist die Unterscheidung von Signal und Hintergrund hier wesentlich schwieriger, da man die Signale nicht eindeutig Chromsomen zuordnen kann. Hinzu kommt, dass mit den

in der Humangenetik vorhanden Mikroskopen nicht alle für die cenM-FISH benötigten Fluorochrome gleichzeitig sichtbar gemacht werden können, so dass eine Auswertung nur mit Hilfe einer CCD- Kamera und Software möglich und demzufolge sehr umständlich und zeitaufwendig wäre. In der Literatur wurden jedoch bereits erfolgreiche Versuche zur dreidimensionalen Darstellung von bis zu fünf Zentromeren beschrieben (Göhlert et al., 2001).

Aus diesem Grund wurden zunächst Kombinationen von fünf bzw. sieben Zentromeren etabliert um so in maximal 5 Hybridisierungsschritten alle Zentromere abzudecken. Ähnliche Ansätze finden sich z.B. bei Plattner et al. (1993a).

Die Vorteile der Interphasezytogenetik liegen darin, dass relativ wenige repräsentative Zellen benötigt werden (Kuo et al. 1991) und dass keine Kultivierung erfolgen muss. Dies würde eine spezifische Diagnose in möglichst kurzer Zeit (1- 2 Tage statt bisher zwischen 8 und 20 Tagen) ermöglichen, was vor allem in der Pränataldiagnostik von großem Vorteil wäre.

Wenig Material steht auch bei der in Deutschland bisher noch nicht erlaubten Präimplantationsdiagnostik (PID) zur Verfügung. Numerische Abberationen in *in vitro* fertilisierten Embryonen werden als mögliche Ursache für eine ausbleibende Implantation angesehen (Wilton, 2002). In einer Studie mit 70 PIDs stand die Häufigkeit der chromosomalen Abweichungen der Embryos im Zusammenhang mit der Anzahl der gescheiterten *In vitro*- Fertilisationsversuche (Magli, et al., 1998). Auch hier wäre es denkbar, dass an nur einer Zelle die korrekte Chromosomenzahl bestimmt wird. Bisher ist es üblich, Sonden für die Chromsomen X, Y, 13, 18 und 21 in die PID zu integrieren. Es steht aber außer Zweifel, dass auch andere numerische Chromsomenaberrationen relativ häufig Ursache eines Abortes oder einer phänotypischen Abweichung sind (Wilton, 2002).

Auch bei der sich in Entwicklung befindenden nicht invasiven Pränataldiagnostik an Embryonalzellen im mütterlichen Blut hat man nur wenig embryonale Zellen zur Verfügung.

Dementsprechend würde sich sowohl bei der PID als auch bei der nicht invasiven Pränataldiagnostik die cenM-FISH- Methode in Interphase, kombiniert mit dreidimensionaler Darstellung, anbieten.

## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene zentromerspezifische Multicolor-Verfahren (cenM-FISH, cenM54-FISH, AcroCenM-FISH) etabliert. Die Techniken wurden in Anlehnung an das bereits bestehende M-FISH-Verfahren entwickelt, d.h. es wurden jeweils 5 verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe (SpectrumOrange, SpectrumRed, SpectrumGreen, Cy5, Diethylaminocumarin) kombiniert. Die Verfahren wurden zunächst an Chromosomen unauffälliger Kontrollpersonen getestet, um sie anschließend auf Fälle mit überzähligen Markerchromosomen anzuwenden.

Das cenM-FISH-Verfahren ermöglicht eine gleichzeitige Darstellung und Unterscheidung aller menschlichen Zentromere (eine molekularzytogenetische Unterscheidung von Zentromer 13 und 21 ist nicht möglich). An fünf Fällen aus der Pränataldiagnostik, einem Fall aus der Postnataldiagnostik, einem Fall aus der Tumorzytogenetik sowie zwei Zelllinien konnte gezeigt werden, dass eine zuverlässige Charakterisierung von kleinen überzähligen Markerchromosomen (SMC) mit Hilfe dieses Verfahrens möglich ist.

Für Fälle mit akrozentrischen Markern (ca. 80% der Fälle mit SMC) wurde der cenM-FISH durch eine alle kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen abdeckende Sonde erweitert (cenM54-FISH).

Für bereits mittels GTG-Bänderung als akrozentrische Marker identifizierte SMC sowie für die Charakterisierung von Normvarianten der kurzen Arme der akrozentrischen Chromosomen konnte ein verlässlich funktionierender AcroCenM-FISH-Mix zusammengestellt werden.

Versuche zur Kombination der cenM-FISH- mit der M-FISH-Technik für eine simultane Beurteilung von Zentromer- und euchromatischem Material wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls durchgeführt.

## 7 Literaturverzeichnis

**Alitalo,-K;** Schwab,-M

Oncogene amplification in tumor cells

Adv-Cancer-Res. 1986; 47: 235-81

**Alitalo,-T;** Tiihonen,-J; Hakola,-P; de-la-Chapelle,-A

Molecular characterization of a Y;15 translocation segregating in a family

Hum-Genet. 1988 May; 79(1): 29-35

**Andersson,-M;** Page,-D-C; Pettay,-D; Subrt,-I; Turleau,-C; de-Grouchy,-J; de-la-Chapelle,-A

Y;autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45,X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11

Hum-Genet. 1988 May; 79(1): 2-7

**Archidiacono,-N;** Antonacci R, Marzella R, Finelli P, Lonoce A, Rocchi M.

Comparative mapping of human alphoid sequences in great apes using fluorescence

in situ hybridization.

Genomics. 1995 Jan 20;25(2):477-84

**Arranz,-E;** Robledo-M; Martinez-B; Gallego-J; Roman-A; Rivas-C; Benitez-J

Incidence of homogeneously staining regions in non-Hodgkin lymphomas

Cancer-Genet-Cytogenet. 1996 Mar; 87(1): 1-3

**Atlas of Genetics** and Cytogenetics in Oncology and Haematology

<http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer>

**Banerjee,-S-K;** Weston AP, Persons DL, Campbell DR

Quick-FISH: a rapid fluorescence in situ hybridization technique for molecular cytogenetic analysis.

Biotechniques. 1998 May;24(5):826-30

**Barry,-A-E,** Howman EV, Cancilla MR, Saffery R, Choo KH.

Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere.

Hum Mol Genet. 1999 Feb;8(2):217-27

**Batanian,-J-R;** Huang-Y; Gottesman-GS; Grange-DK; Blasingame-AV

Preferential involvement of the short arm in chromosome 8-derived supernumerary markers and ring as identified by chromosome arm painting

Am-J-Med-Genet. 2000 Feb 14; 90(4): 276-82

**Battaglia,-A,** Gurrieri F, Bertini E, Bellacosa A, Pomponi MG,

Paravatou-Petsotas M, Mazza S, Neri G.

The inv dup(15) syndrome: a clinically recognizable syndrome with altered behavior, mental retardation, and epilepsy.

Neurology. 1997 Apr;48(4):1081-6

**Benn,-P-A;** Hsu,-L-Y

Incidence and significance of supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnosis

Am-J-Hum-Genet. 1984 Sep; 36(5): 1092-102

**Benner,-S-E;** Wahl,-G-M; Von-Hoff,-D-D

Double minute chromosomes and homogeneously staining regions in tumors taken directly from patients versus in human tumor cell lines

Anticancer-Drugs. 1991 Feb; 2(1): 11-25

**Blennow,-E;** Anneren-G; Bui-TH; Berggren-E; Asadi-E; Nordenskjold-M

Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization (FISH)

Am-J-Hum-Genet. 1993 Aug; 53(2): 433-42

**Blennow,-E;** Bui,-T-H; Kristoffersson,-U; Vujic,-M; Anneren,-G; Holmberg,-E; Nordenskjold,-M

Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39 105 consecutive prenatal diagnoses: prevalence and characterization by fluorescence in situ hybridization

Prenat-Diagn. 1994 Nov; 14(11): 1019-28

**Boehringer Mannheim**

Nonradioactive In Situ Hybridization

Application Manual

**Borgatti,-R;** Piccinelli,-P; Passoni,-D; Raggi,-E; Ferrarese,-C

Pervasive developmental disorders and GABAergic system in patients with inverted duplicated chromosome 15

J-Child-Neurol. 2001 Dec; 16(12): 911-4

**Borghgraef,-M;** Fryns,-J-P

Clinical and psychological findings in three young children with full or partial trisomy of chromosome 8

Tijdschr Orthoped Kinderpsych. 1987; 9-22

Schinzel S.367

**Bossuyt,-P-J;** Van Tienen,-M-N; De Gruyter,-L; Smets,-V; Dumon,-J; Wauters,-J

Incidence of low-fluorescence  $\alpha$ -satellite region of chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH

Cytogenetics and Cell Genetics. 1995; 68:203-206

**Bridge,-J-A;** Nelson-M; McComb-E; McGuire-MH; Rosenthal-H; Vergara-G;

Maale-GE; Spanier-S; Neff-JR

Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature

Cancer-Genet-Cytogenet. 1997 May; 95(1): 74-87

**Brondum-Nielsen,-K; Mikkelsen-M**

A 10-year survey, 1980-1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosomes, identified by FISH analysis. Outcome and follow-up of 14 cases diagnosed in a series of 12,699 prenatal samples  
Prenat-Diagn. 1995 Jul; 15(7): 615-9

**Buckton,-K-E; Spowart,-G; Newton,-M-S; Evans,-H-J**

Forty four probands with an additional "marker" chromosome  
Hum-Genet. 1985; 69(4): 353-70

**Buddecke,-E**

Grundriss der Biochemie  
DeGruyter, Berlin, New York; 8.Aufl.;1989

**Bukvic,-N; Susca,-F; Gentile,-M; Tangari,-E; Ianniruberto,-A; Guanti,-G**

An unusual dicentric Y chromosome with a functional centromere with no detectable alpha-satellite  
Hum-Genet. 1996 Apr; 97(4): 453-6

**Butler,-M-G; Roback,-E-W; Allen,-G-A; Dev,-V-G**

Identification of a ring chromosome as a ring 8 using fluorescent in situ hybridization (FISH) in a child with multiple congenital anomalies  
Am-J-Med-Genet. 1995 Jul 3; 57(3): 494-5

**Calabrese,-G; Stuppia,-L; Mingarelli,-R; Guanciali-Franchi,-P; Peila,-R; Morizio,-E; Antonucci,-A; Palka,-G**

Molecular characterization of two extra marker chromosomes detected at prenatal diagnosis  
Ann-Genet. 1994; 37(3): 135-8

**Callen,-D-F; Eyre,-H-J; Ringenbergs,-M-L; Freemantle,-C-J; Woodroffe,-P; Haan,-E-A**

Chromosomal origin of small ring marker chromosomes in man: characterization by molecular genetics  
Am-J-Hum-Genet. 1991 Apr; 48(4): 769-82

**Callen,-D-F, Eyre H, Yip MY, Freemantle J, Haan EA.**

Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes.  
Am J Med Genet. 1992 Jul 1;43(4):709-15

**Callen,-D-F; Eyre,-H; Fang,-Y-Y; Guan,-X-Y; Veleba,-A; Martin,-N-J; McGill,-J; Haan,-E-A**

Origins of accessory small ring marker chromosomes derived from chromosome 1  
J-Med-Genet. 1999 Nov; 36(11): 847-53

**Casey,-J; Davidson,-N**

Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide  
Nucleic Acid Research. 1977; Vol 4, No.5; pp1539- 1552

**Caspersson,-T**; Farber,-S; Foley,-G-E; Kudynowski,-J; Modest,-E-J; Simonsson,-E; Wagh,-U; Zech,-L  
Chemical differentiation along metaphase chromosomes.  
Exp-Cell-Res. 1968 Jan; 49(1): 219-22

**Caspersson,-T**; Zech,-L; Johansson,-C  
Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents.  
Exp-Cell-Res. 1970a Oct; 62(2): 490-2

**Caspersson,-T**; Zech,-L; Johansson,-C; Modest,-E-J  
Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents.  
Chromosoma. 1970b; 30(2): 215-27

**Chen,-H**; Kusyk,-C-J; Tuck-Muller,-C-M; Martinez,-J-E; Dorand,-R-D; Wertelecki,-W  
Confirmation of proximal 1q duplication using fluorescence in situ hybridization  
Am-J-Med-Genet. 1994 Mar 1; 50(1): 28-31

**Chen,-H**; Tuck-Muller,-C-M; Batista,-D-A; Wertelecki,-W  
Identification of supernumerary ring chromosome 1 mosaicism using fluorescence in situ hybridization  
Am-J-Med-Genet. 1995 Mar 27; 56(2): 219-33

**Cheung,-VG**, Nelson SF.  
Whole genome amplification using a degenerate oligonucleotide primer allows hundreds of genotypes to be performed on less than one nanogram of genomic DNA.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Dec 10;93(25):14676-9

**Choo,-K-H-A**  
The centromere  
Oxford University Press Inc, New York; 1997

**Chudoba,-I**, Franke Y, Senger G, Sauerbrei G, Demuth S, Beensen V, Neumann A, Hansmann I, Claussen U  
Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation  
Europ J Hum Genet. 1999, 75: 33-40.

**Chudoba,-I**; Plesch,-A; Lorch,-T; Lemke,-J; Claussen,-U; Senger,-G  
High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes.  
Cytogenet-Cell-Genet. 1999; 84(3-4): 156-60

**Cohen,-M-M**, Frederick RW, Balkin NE, Simpson SJ.  
The identification of Y chromosome translocations following Distamycin A treatment.  
Clin Genet. 1981 May;19(5):335-42

**Cooke,-H-J**; Hindley,-J

Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes

Nucleic-Acids-Res. 1979 Jul 25; 6(10): 3177-97

**Corneo,-G**, Ginelli E, Polli E.

A satellite DNA isolated from human tissues.

J Mol Biol. 1967 Feb 14;23(3):619-22

**Crolla,-J-A**; Harvey,-J-F; Sitch,-F-L; Dennis,-N-R

Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular and FISH approach to diagnosis and prognosis

Hum-Genet. 1995 Feb; 95(2): 161-70

**Crolla,-JA**; Long-F; Rivera-H; Dennis-NR

FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosomes 15 and 22: I. Results of 26 new cases

Am-J-Med-Genet. 1998a Feb 3; 75(4): 355-66

**Crolla,-J-A**

FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature.

Am-J-Med-Genet. 1998b Feb 3; 75(4): 367-81

**Daniel,-A**; Malafiej,-P; Preece,-K; Chia,-N; Nelson,-J; Smith,-M

Identification of marker chromosomes in thirteen patients using FISH probing

Am-J-Med-Genet. 1994 Oct 15; 53(1): 8-18

**de-Silva,-D**; Massie,-D; Drummond,-J; Couzin,-D; Dean,-J-C

Mosaicism for a tandem duplication dup(1)(q12q22) in an 18 year old female

J-Med-Genet. 1998 Jul; 35(7): 600-3

**Djalali,-M**

The significance of accessory bisatellited marker chromosomes in amniotic fluid cell cultures

Ann-Genet. 1990; 33(3): 141-5

**du Sart,-D**, Cancilla MR, Earle E, Mao JI, Saffery R, Tainton KM, Kalitsis P, Martyn J, Barry AE, Choo KH.

A functional neo-centromere formed through activation of a latent human centromere and consisting of non-alpha-satellite DNA.

Nat Genet. 1997 Jun;16(2):144-53

**Durm,-M**, Haar FM, Hausmann M, Ludwig H, Cremer C.

Optimized Fast-FISH with alpha-satellite probes: acceleration by microwave activation.

Braz J Med Biol Res. 1997 Jan;30(1):15-23



**Durm,-M**, Sorokine-Durm I, Haar F, Hausmann M, Ludwig H, Voisin P, Cremer C.  
Fast-FISH technique for rapid, simultaneous labeling of all human centromeres.  
Cytometry. 1998 Mar 1;31(3):153-62

**Earnshaw,-W-C**, Rattner JB  
A map of the centromere (primary constriction) in vertebrate chromosomes at metaphase  
Prog Clin Biol Res. 1989;318:33-42.

**Feinberg,-A-P**; Vogelstein,-B  
"A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum.  
Anal-Biochem. 1984 Feb; 137(1): 266-7

**Ferguson-Smith,-M-A**, Yates JR  
Maternal age specific rates for chromosome aberrations and factors influencing them: report of a collaborative european study on 52 965 amniocenteses  
Prenat Diagn. 1984 Spring;4 Spec No:5-44

**Fletcher,-J-A**; Gebhardt-MC; Kozakewich-HP  
Cytogenetic aberrations in osteosarcomas. Nonrandom deletions, rings, and double-minute chromosomes  
Cancer-Genet-Cytogenet. 1994 Oct; 77(1): 81-8

**Fonatsch,-C**; Nowotny,-H; Pittermann-Hocker,-E; Streubel,-B; Jager,-U; Valent,-P; Buchner,-T; Lechner,-K  
Amplification of ribosomal RNA genes in acute myeloid leukemia  
Genes-Chromosomes-Cancer. 2001 Sep; 32(1): 11-7

**Ford,-C-E** and Hamerton, J. L  
The chromosomes of man  
Nature. 1956; 178: 1020-1023

**Ford,-C-E**, Jones KW, Polani PE et al.  
A Sex Chromosomal Anomaly in a Case of Gonadal Dysgenesis (Turner's syndrome)  
Lancet. 1959;1: 711-713

**Forus,-A**; Weghuis-D; Smeets-D; Fodstad-O; Myklebost-O; Geurts-van-Kessel-A  
Comparative genomic hybridization analysis of human sarcomas: II. Identification of novel amplicons at 6p and 17p in osteosarcomas  
Genes-Chromosomes-Cancer. 1995 Sep; 14(1): 15-21

**Forus,-A**; Berner,-J-M; Meza-Zepeda,-L-A; Saeter,-G; Mischke,-D; Fodstad,-O; Myklebost,-O  
Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas  
Br-J-Cancer. 1998 Aug; 78(4): 495-503

**Fryns,-J-P**; Cassiman,-J-J; Van-den-Berghe,-H  
Tertiary partial 14 trisomy 47, XX, plus 14q minus  
Humangenetik. 1974; 24(1): 71-7

**Fryns,-J-P**; Klecykowska,-A; Van den Berghe,-H  
Clinical manifestations of Y/autosome translocations in man  
In: Sandberg AA (ed), The Y chromosome, part B: Clinical aspects of Y  
chromosome abnormalities  
Liss, New York; 1985; pp213-243

**Fujita,-H**, Sakamoto Y, Hamamoto Y.  
An extra idic(15p)(q11) chromosome in Prader-Willi syndrome.  
Hum Genet. 1980;55(3):409-11

**Funderburk,-S-J**; Klisak,-I; Sparkes,-R-S; Carrel,-R-E  
Familial Y-autosome translocation in two unrelated girls  
Ann-Genet. 1982; 25(2): 119-22

**Furforo,-L**; Rittler,-M; Slavutsky,-I-R  
Proximal trisomy 1q in a girl with developmental delay and minor anomalies  
Am-J-Med-Genet. 1996 Sep 6; 64(4): 551-5

**Gabarron,-J**, Glover G, Jimenez A, Lamata E.  
Pseudoisodicentric bisatellited extra marker chromosome (tetrasomy  
22pter----q11, trisomy Yqh), derived from a maternal Y/22 translocation.  
Association between this tetrasomy and "cat eye" phenotypical features.  
Clin Genet. 1985 Dec;28(6):509-15

**Gamberi,-G**, Ragazzini P, Benassi MS, Ferrari C, Sollazzo MR, Molendini L,  
Merli M, Magagnoli G, Ruggieri P, Balladelli A, Orlando C, Bacchini P, Pazzagli  
M, Picci P.  
Analysis of 12q13-15 genes in parosteal osteosarcoma.  
Clin Orthop. 2000 Aug;(377):195-204

**Germain-Lee,-E-L**, Schiffman G, Mules EH, Lederman HM.  
Selective deficiency of antibody responses to polysaccharide antigens in a child  
mosaic for partial trisomy 1 (46,XX,dir dup (1) (q12----q23)/46,XX).  
J Pediatr. 1990 Jul;117(1 Pt 1):96-9

**Giardino,-D**; Bettio,-D; Gottardi,-G; Rizzi,-N; Pierluigi,-M; Perfumo,-C; Cali,-A;  
Dagna-Bricarelli,-F; Larizza,-L  
FISH characterization of two supernumerary r(1) associated with distinct clinical  
phenotypes  
Am-J-Med-Genet. 1999 Jun 4; 84(4): 377-80

**Gisselsson,-D**; Hoglund-M; Mertens-F; Mitelman-F; Mandahl-N  
Chromosomal organization of amplified chromosome 12 sequences in  
mesenchymal tumors detected by fluorescence in situ hybridization  
Genes-Chromosomes-Cancer. 1998 Nov; 23(3): 203-12

**Gisselsson,-D**, Hoglund M, Mertens F, Johansson B, Dal Cin P, Van den Berghe H, Earnshaw WC, Mitelman F, Mandahl N  
The structure and dynamics of ring chromosomes in human neoplastic and non-neoplastic cells  
Hum Genet. 1999 Apr;104(4):315-25

**Gisselsson,-D**; Hoglund-M; Mertens-F; Mandahl-N  
Variable stability of chromosomes containing amplified alpha-satellite sequences in human mesenchymal tumours  
Chromosoma. 1999 Sep; 108(5): 271-7

**Gisselsson,-D**, Palsson E, Hoglund M, Domanski H, Mertens F, Pandis N, Sciort R, Dal Cin P, Bridge JA, Mandahl N  
Differentially amplified chromosome 12 sequences in low- and high-grade osteosarcoma  
Genes Chromosomes Cancer. 2002 Feb;33(2):133-40

**Göhlert,- A**; Rieman,-I; Nietzel,-A; Rubtsov,-N; Tifonov,-V; Claussen,-U; Liehr,-T; König,-K  
A new versatile technique to detect specific sequences within single DNA molecules; Mutiphoton mulicolor FISH (MM-FISH)  
Europ J Hum Genet 2001, Vol 9/S1 pp142-143, Abstractnr. P0214

**Goodpasture,-C**; Bloom,-S-E  
Visualization of nucleolar organizer regions im mammalian chromosomes using silver staining.  
Chromosoma. 1975 Nov 20; 53(1): 37-50

**Grady,-D-L**, Ratliff RL, Robinson DL, McCanlies EC, Meyne J, Moyzis RK.  
Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Mar 1;89(5):1695-9

**Gravholt,-C-H**; Friedrich-U  
Molecular cytogenetic study of supernumerary marker chromosomes in an unselected group of children  
Am-J-Med-Genet. 1995 Mar 13; 56(1): 106-11

**Grosso,-S**; Balestri,-P; Anichini,-C; Bartalini,-G; Pucci,-L; Morgese,-G; Berardi,-R  
Pubertal disorders in inv dup(15) syndrome  
Gynecol-Endocrinol. 2001 Jun; 15(3): 165-9

**Haaf,-T**; Feichtinger,-W; Guttenbach,-M; Sanchez,-L; Muller,-C-R; Schmid,-M  
Berenil-induced undercondensation in human heterochromatin  
Cytogenet-Cell-Genet. 1989; 50(1): 27-33

**Haaf,-T**; Warburton-PE; Willard-HF  
Integration of human alpha-satellite DNA into simian chromosomes: centromere protein binding and disruption of normal chromosome segregation  
Cell. 1992 Aug 21; 70(4): 681-96

**Haddad,-BR**, Schrock E, Meck J, Cowan J, Young H, Ferguson-Smith MA, du Manoir

S, Ried T.

Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping.

Hum Genet. 1998 Nov;103(5):619-25

**Hamerton,-J-L**

Human Cytogenetics

2 vols. New York: Academic Press (1971)

**Hamerton,-J-L**; Canning,-N; Ray,-M; Smith,-S

A cytogenetic survey of 14,069 newborn infants. I. Incidence of chromosome abnormalities.

Clin-Genet. 1975 Oct; 8(4): 223-43

**Hastings,-R-J**; Nisbet,-D-L; Waters,-K; Spencer,-T; Chitty,-L-S

Prenatal detection of extra structurally abnormal chromosomes (ESACs): new cases and a review of the literature

Prenat-Diagn. 1999 May; 19(5): 436-45

**Heartlein,-M-W**; Knoll-JH; Latt-SA

Chromosome instability associated with human alphoid DNA transfected into the Chinese hamster genome

Mol-Cell-Biol. 1988 Sep; 8(9): 3611-8

**Heller,-R**, Brown KE, Burgtorf C, Brown WR.

Mini-chromosomes derived from the human Y chromosome by telomere directed chromosome breakage.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 9;93(14):7125-30

**Henegariu,-O**; Bray-Ward,-P; Artan,-S; Vance,-G-H; Qumsyieh,-M; Ward,-D-C

Small marker chromosome identification in metaphase and interphase using centromeric multiplex fish (CM-FISH)

Lab-Invest. 2001 Apr; 81(4): 475-81

**Hliscs,-R**, Muhlig P, Claussen U.

The spreading of metaphases is a slow process which leads to a stretching of chromosomes

Cytogenetics and Cell Genetics. 1997; 76:167-171

**Hoogerwerf,-W-A**; Hawkins-AL; Perlman-EJ; Griffin-CA

Chromosome analysis of nine osteosarcomas

Genes-Chromosomes-Cancer. 1994 Feb; 9(2): 88-92

**Hook,-E-B**; Cross,-P-K

Extra structurally abnormal chromosomes (ESAC) detected at amniocentesis: frequency in approximately 75,000 prenatal cytogenetic diagnoses and associations with maternal and paternal age

Am-J-Hum-Genet. 1987 Feb; 40(2): 83-101

**Hopman,-A-H;** Wiegant,-J; van-Duijn,-P

Mercurated nucleic acid probes, a new principle for non-radioactive in situ hybridization.

Exp-Cell-Res. 1987 Apr; 169(2): 357-68

**Hsu,-T-C**

Mammalian chromosomes in vitro. 1. karyotype of man

J of Heredity. 1952; 43, 167-172

**Hughes,-A**

Some effects of abnormal tonicity on dividing cells in chick tissue cultures

Quart J of Mikroskop Sci. 1952; 93,207

**Jacobs,-P-A;** Buckton,-K-E; Cunningham,-C; Newton,-M

An analysis of the break points of structural rearrangements in man

J-Med-Genet. 1974 Mar; 11(1): 50-64

**John,-HA;** Birnstiel-ML; Jones-KW

*RNA-DNA hybrids at the cytological level*

Nature. 1969 Aug 9; 223(206): 582-7

**Johnson,-G-D;** De C Nogueira Araujo G.M

A simple method for reducing the fading of immunofluorescence during microscopy

J. Immunol. Methods. 43:349, 1981

**Jorgensen,-A-L**

Alphoid repetitive DNA in human chromosomes.

Dan Med Bull. 1997 Nov;44(5):522-34

**Kaluzewski,-B;** Helszer,-Z; Constantinou,-M; Burkholder,-S-W; Coutinho,-W-G;

Skorski,-M; Corridori,-L; Anderson,-C-E; Sherwood,-M; Debiec-Rychter,-M;

Jackson,-L-G

Extra structurally abnormal chromosomes (ESACs)--presentation of 10 new cases

Med-Sci-Monit. 2001 May-Jun; 7(3): 427-34

**Kelly,-R-B,** Cozzarelli NR, Deutscher MP, Lehman IR, Kornberg A.

Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break.

J Biol Chem. 1970 Jan 10;245(1):39-45

**Kessler,-C;** Holtke,-H-J; Seibl,-R; Burg,-J; Muhlegger,-K

Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. I. A novel DNA labeling and detection system based on digoxigenin: anti-digoxigenin ELISA principle (digoxigenin system).

Biol-Chem-Hoppe-Seyler. 1990 Oct; 371(10): 917-27

**Khatib,-Z,A,** Matsushime H, Valentine M, Shapiro DN, Sherr CJ, Look AT.

Coamplification of the CDK4 gene with MDM2 and GLI in human sarcomas.

Cancer Res. 1993 Nov 15;53(22):5535-41

- Klinger,-K**; Landes G, Shook D, Harvey R, Lopez L, Locke P, Lerner T, Osathanondh R, Leverone B, Houseal T, et al.  
Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence in situ hybridization (FISH).  
Am J Hum Genet. 1992 Jul;51(1):55-65
- Koduru,-P-R**, Goh JC, Pergolizzi RG, Lichtman SM, Broome JD.  
Molecular characterization of a variant Ph1 translocation t(9;22;11) (q34;q11;q13) in chronic myelogenous leukemia (CML) reveals the translocation of the 3'-part of BCR gene to the chromosome band 11q13.  
Oncogene. 1993 Dec;8(12):3239-47
- Kools,-P-F**; Van-de-Ven-WJ  
Amplification of a rearranged form of the high-mobility group protein gene HMGIC in OsA-CI osteosarcoma cells  
Cancer-Genet-Cytogenet. 1996 Oct 1; 91(1): 1-7
- Kotzot,-D**  
Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15  
Am-J-Med-Genet. 1999 Jan 29; 82(3): 265-74
- Kühl,-H**, Rottger S, Heilbronner H, Enders H, Schempp W.  
Loss of the Y chromosomal PAR2-region in four familial cases of satellited Y chromosomes (Yqs).  
Chromosome Res. 2001;9(3):215-22
- Kuo,-W-L**, Tenjin H, Segreaves R, Pinkel D, Golbus MS, Gray J.  
Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes.  
Am J Hum Genet. 1991 Jul;49(1):112-9
- Ladanyi,-M**, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH.  
MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma.  
Cancer Res. 1993 Jan 1;53(1):16-8
- Landegent,-J-E**, Jansen in de Wal N, Dirks RW, Baao F, van der Ploeg M.  
Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization.  
Hum Genet. 1987 Dec;77(4):366-70
- Landegent,-J-E**; Jansen-in-de-Wal,-N; Baan,-R-A; Hoeijmakers,-J-H; Van-der-Ploeg,-M  
2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences.  
Exp-Cell-Res. 1984 Jul; 153(1): 61-72
- Langer,-P-R**; Waldrop-AA; Ward-DC  
*Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes*  
Proc-Natl-Acad-Sci-USA. 1981 Nov; 78(11): 6633-7

**Langer,-S**; Fauth,-C; Rocchi,-M; Murken,-J; Speicher,-M-R  
AcroM fluorescent in situ hybridization analyses of marker chromosomes  
Hum-Genet. 2001 Aug; 109(2): 152-8

**Lanphear,-N**, Lamb A, Oppenheimer S, Soukup S.  
Supernumerary chromosome marker (1) in a developmentally delayed child.  
Am J Med Genet. 1995 Jul 3;57(3):400-2

**Le-Baccon,-P**; Leroux,-D; Dascalescu,-C; Duley,-S; Marais,-D; Esmenjaud,-E;  
Sotto,-J-J; Callanan,-M  
Novel evidence of a role for chromosome 1 pericentric heterochromatin in the  
pathogenesis of B-cell lymphoma and multiple myeloma  
Genes-Chromosomes-Cancer. 2001 Nov; 32(3): 250-64

**Ledbetter,-D-H**, Engel E.  
Uniparental disomy in humans: development of an imprinting map and its  
implications for prenatal diagnosis.  
Hum Mol Genet. 1995;4 Spec No:1757-64

**Lee,-C**; Wevrick,-R; Fisher,-R-B; Ferguson-Smith,-M-A; Lin,-C-C  
Human centromeric DNAs  
Hum Genet. (1997) 100:291-304

**Leitch,- A-R**; Schwarzacher, T; Jackson, D; Leitch, I.J.  
In situ-Hybridisierung  
Aus dem Engl. uebers. von Beate Bettenhausen  
Spektrum Akad. Verl.· Heidelberg, Berlin, Oxford (1994)

**Lejeune,-J**  
De la duplication de structures circulaires.  
[On the duplication of circular structures]  
Ann-Genet. 1968 Jun; 11(2): 71-7

**Lejeune,-J**, Turpin, R. & Gautier, M  
Le mongolisme. Premier exemple d'aberration autosomique humaine  
Annales de Génétique. (Jul 1959). 1(2), 41-9

**Levan,-A**  
The effect of colchicine on root mitoses in Allium  
Hereditas. 1938; 24, 471-486

**Li,-M-M**; Howard-Peebles,-P-N; Killos,-L-D; Fallon,-L; Listgarten,-E; Stanley,-W-S  
Characterization and clinical implications of marker chromosomes identified at  
prenatal diagnosis  
Prenat-Diagn. 2000 Feb; 20(2): 138-43

**Lichter,-P**, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, Ward DC  
Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells  
by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries  
Hum Genet. 1988, 80:224-234

**Liehr,-T**, Pfeiffer R A, Trautmann U

Typical and partial cat eye syndrome: identification of the marker chromosome by FISH.

Clin Genet. 1992; Vol 42, pp 91-96.

**Liehr,-T**, Thoma K, Kammler K, Gehring C, Ekici A, Bathke K D, Grehl H, Rautenstrauss B

Direct preparation of uncultured EDTA-treated or heparinized blood for interphase FISH analysis

Appl Cytogenet. 1995; Vol 21, pp 185-188.

**Liehr,-T**, Park O, Feuerstein B G, Gebhart E, Rautenstrauss B

The peripheral myelin protein 22kDa (PMP22) gene is amplified in cell lines derived from glioma and osteogenic sarcoma: a new candidate for an oncogene?

Int J Onc. 1997, Vol 10, pp 915-919.

**Liehr,-T**, Pfeiffer RA, Trautmann U, Gebhart E.

Centromeric alphoid DNA heteromorphisms of chromosome 22 revealed by FISH-technique.

Clin Genet. 1998 Mar;53(3):231-2

**Liehr,-T**, Claussen,-U

Current developments in human molecular cytogenetic techniques

Curr Mol Med. 2002a, Vol 2, pp 283-297.

**Liehr,-T**, Claussen,-U.

Review: Multicolor-FISH approaches for the characterization of human chromosomes in clinical genetics and tumor cytogenetics.

Current Genomics 2002b, Vol. 3, pp 213-235

**Liehr,-T**, Heller A, Starke H, Rubtsov N, Trifonov V, Mrasek K, Weise A, Kuechler A, Claussen U.

Microdissection based high resolution multicolor banding for all 24 human chromosomes.

Int J Mol Med. 2002c Apr;9(4):335-9

**Lo,-A-W-I**; Liao,G-C-C; Rocchi,-M; Choo,-K-H-A

Extreme Reduction of Chromosome-Specific  $\alpha$ - Satellite Array Is Unusually Common in Human Chromosome 21

Genome Research. 9:895-908, 1999

**Lopez-Gines,-C**; Carda-Batalla-C; Lopez-Terrada-L; Llombart-Bosch-A

Presence of double minutes and monosomy 17p in xenografted human osteosarcomas

Cancer-Genet-Cytogenet. 1996 Aug; 90(1): 57-62

**Mackie-Ogilvie,-C**; Harrison,-R-H; Horsley,-S-W; Hodgson,-S-V; Kearney,-L

A mitotically stable marker chromosome negative for whole chromosome libraries, centromere probes and chromosome specific telomere regions: a novel class of supernumerary marker chromosome?

Cytogenet-Cell-Genet. 2001; 92(1-2): 69-73



**Magli,-MC**, Gianaroli L, Munne S, Ferraretti AP.

Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients.

J Assist Reprod Genet. 1998 May;15(5):297-301

**Magnani,-I**; Meneveri,-R; Marozzi,-A; Ginelli,-E; Fuhrman-Conti,-A-M; Darfler,-M; Monard,-S-P; Sacchi,-N

Functional marker chromosomes lacking detectable alpha satellite DNA: a tool for centromere study

Chromosome-Res. 1998 Jan; 6(1): 69-71

**Mahtani,-M-M**; Willard-HF

Pulsed-field gel analysis of alpha-satellite DNA at the human X chromosome centromere: high-frequency polymorphisms and array size estimate

Genomics. 1990 Aug; 7(4): 607-13

**Manenti,-E**

Two extra inv dup(15) chromosomes and male infertility: second case

Am-J-Med-Genet. 1992 Feb 1; 42(3): 402-3

**Maraschio,-P**; Zuffardi,-O; Dalla-Fior,-T; Tiepolo,-L

Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome

J-Med-Genet. 1988 Mar; 25(3): 173-80

**Maraschio,-P**, Tupler R, Rossi E, Barbierato L, Uccellatore F, Rocchi M, Zuffardi O, Fraccaro M.

A novel mechanism for the origin of supernumerary marker chromosomes.

Hum Genet. 1996 Mar;97(3):382-6

**Maratou,-K**, Siddique Y, Kessling AM, Davies GE.

Novel methodology for the detection of chromosome 21-specific alpha-satellite DNA sequences.

Genomics. 1999 May 1;57(3):429-32

**Marcais,-B**, Bellis M, Gerard A, Pages M, Boublik Y, Roizes G.

Structural organization and polymorphism of the alpha satellite DNA sequences of chromosomes 13 and 21 as revealed by pulse field gel electrophoresis.

Hum Genet. 1991 Jan;86(3):311-6

**Martin-Lucas,-M-A**, Perez-Castillo A, Abrisqueta JA.

Infertility associated with two accessory bisatellited chromosomes.

Hum Genet. 1986 Jun;73(2):133-6

**Mascarello,-J-T**; Jones,-M-C; Chambers,-S-R

A patient with extreme variation in number and size of small marker chromosomes

Hum-Genet. 1987 Feb; 75(2): 191-4

**Mattei,-J-F**, Mattei MG, Giraud F.

Prader-Willi syndrome and chromosome 15. A clinical discussion of 20 cases.

Hum Genet. 1983;64(4):356-62

**McClintock,-B**

The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes  
Genetics. 1938, 23:315-376

**Melnyk,-A-R; Dewald-G**

Identification of a small supernumerary ring chromosome 8 by fluorescent in situ hybridization in a child with developmental delay and minor anomalies  
Am-J-Med-Genet. 1994 Mar 1; 50(1): 12-4

**Meneveri,-R, Agresti A, Della Valle G, Talarico D, Siccardi AG, Ginelli E.**

Identification of a human clustered G + C-rich DNA family of repeats (Sau3A family).  
J Mol Biol. 1985 Dec 5;186(3):483-9

**Mertens,-F; Mandahl-N; Orndal-C; Baldetorp-B; Bauer-HC; Rydholm-A; Wiebe-T; Willen-H; Akerman-M; Heim-S; et-al**

Cytogenetic findings in 33 osteosarcomas  
Int-J-Cancer. 1993 Aug 19; 55(1): 44-50

**Meyne,-J; Littlefield,-L-G; Moyzis,-R-K**

Labeling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: application to the scoring of chromosome aberrations  
Mutation Research. 226:75-79 (1989)

**Meyne,-J, Goodwin EH, Moyzis RK.**

Chromosome localization and orientation of the simple sequence repeat of human satellite I DNA.  
Chromosoma. 1994 Apr;103(2):99-103

**Michalski,-K; Rauer,-M; Williamson,-N; Perszyk,-A; Hoo,-J-J**

Identification, counselling, and outcome of two cases of prenatally diagnosed supernumerary small ring chromosomes  
Am-J-Med-Genet. 1993 Apr 1; 46(1): 88-94

**Mitelman,-F**

ISCN (1995): An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, S Karger, Basel (1995)

**Mitelman,-F**

Catalog of chromosome aberrations in cancer  
Wiley-Liss, New York, 6<sup>th</sup> edn.; 1998

**Mizunoe,-T; Young,-S-R**

Low fluorescence alpha satellite region yields negative result  
Prenat-Diagn. 1992 Jun; 12(6): 549-50

**Mohandas,-T; Canning,-N; Chu,-W; Passage,-M-B; Anderson,-C-E; Kaback,-M-M**

Marker chromosomes: cytogenetic characterization and implications for prenatal diagnosis  
Am-J-Med-Genet. 1985 Feb; 20(2): 361-8

**Moorehead,-P-S**; Nowell,-P-C; Mellman,-W-J

Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood  
Exp Cell Res. 1960; 20, 613-616

**Morison,-I-M**; Reeve,-A-E

A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals  
Hum-Mol-Genet. 1998; 7(10): 1599-609

**Moyzis,-R-K**; Albright,-K-L; Bartholdi,-M-F; Cram,-L-S; Deaven,-L-L; Hildebrand,-S-E; Joste,-N-E; Longmire,-J-L; Meyne,-J; Schwarzacher-Robinson,-T  
Human chromosome-specific repetitive DNA sequences: Novel markers for genetic analysis  
Chromosoma. 375-386 (1987)

**Mühlhardt,-C**

Der Experimentator: Molekularbiologie  
Fischer, Stuttgart (1999)

**Muleris,-M**; Almeida,-A; Gerbault-Seureau,-M; Malfoy,-B; Dutrillaux,-B

Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique  
Genes-Chromosomes-Cancer. 1994 Jul; 10(3): 160-70

**Mullis,-K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.

Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.  
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263-73

**Murata,-H**; Kusuzaki-K; Takeshita-H; Hirasawa-Y; Ashihara-T; Abe-T; Inazawa-J  
Aberrations of chromosomes 1 and 17 in six human osteosarcoma cell lines using double-target fluorescence in situ hybridization  
Cancer-Genet-Cytogenet. 1998 Nov; 107(1): 7-10

**Nederlof,-PM**; Robinson-D; Abuknesha-R; Wiegant-J; Hopman-AH; Tanke-HJ; Raap-AK

Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences.  
Cytometry. 1989 Jan; 10(1): 20-7

**Nederlof,-P-M**; van-der-Flier,-S; Vrolijk,-J; Tanke,-H-J; Raap,-A-K

Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple in situ hybridization by digital imaging microscopy.  
Cytometry. 1992; 13(8): 839-45

**Nielsen,-J**; Rasmussen K.

Extra marker chromosome in newborn children.  
Hereditas. 1975;81(2):221-4

**Nielsen,-J**; Sillesen,-I

Incidence of chromosome aberrations among 11148 newborn children.  
Humangenetik. 1975 Oct 20; 30(1): 1-12

**Nielsen,-J**; Rasmussen K.

Autosomal reciprocal translocations and 13/14 translocations: a population study.

Clin Genet. 1976 Sep;10(3):161-77

**Nielsen,-J**; Wohlerl,-M

Chromosome abnormalities found among 34,910 newborn children: results from a 13-year incidence study in Aarhus, Denmark.

Hum-Genet. 1991 May; 87(1): 81-3

**Nietzel,-A**, Starke H, Heller A, Senger G, Claussen U, Liehr T

Centromere specific 24-color-FISH - a new approach for the characterization of marker chromosomes

Med Genetik. 1999; Vol 11, p 132-133 (Abstract Nr. W11-6)

**Nietzel,-A**, Rocchi M, Starke H, Heller A, Fiedler W, Wlodarska I, Loncarevic IF, Beensen V, Claussen U, Liehr T.

A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH).

Hum Genet. 2001 Mar;108(3):199-204

**Ohashi,-H**; Wakui,-K; Ogawa,-K; Okano,-T; Niikawa,-N; Fukushima,-Y

A stable acentric marker chromosome: possible existence of an intercalary ancient centromere at distal 8p

Am-J-Hum-Genet. 1994 Dec; 55(6): 1202-8

**Oliner,-J-D**; Kinzler-KW; Meltzer-PS; George-DL; Vogelstein-B

Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas

Nature. 1992 Jul 2; 358(6381): 80-3

**Page,-S-L**; Shaffer-LG

Chromosome stability is maintained by short intercentromeric distance in functionally dicentric human Robertsonian translocations

Chromosome-Res. 1998 Feb; 6(2): 115-22

**Pardue,-M-L**; Gall,-J-G

Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations.

Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A. 1969 Oct; 64(2): 600-4

**Pedeutour,-F**; Suijkerbuijk-RF; Forus-A; Van-Gaal-J; Van-de-Klundert-W;

Coindre-JM; Nicolo-G; Collin-F; Van-Haelst-U; Huffermann-K; et-al

Complex composition and co-amplification of SAS and MDM2 in ring and giant rod marker chromosomes in well-differentiated liposarcoma

Genes-Chromosomes-Cancer. 1994 Jun; 10(2): 85-94

**Pich,-U**, Houben A, Fuchs J, Meister A, Schubert I.

Utility of DNA amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR) from

the total genome and defined chromosomal regions of field bean.

Mol Gen Genet. 1994 Apr;243(2):173-7

- Plattner,-R**; Heerema,-N-A; Yurov,-Y-B; Palmer,-C-G  
Efficient identification of marker chromosomes in 27 patients by stepwise hybridization with alpha-satellite DNA probes  
Hum-Genet. 1993a Mar; 91(2): 131-40
- Plattner,-R**; Heerema,-N-A; Howard-Peebles,-P-N; Miles,-J-H; Soukup,-S; Palmer,-C-G  
Clinical findings in patients with marker chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization  
Hum-Genet. 1993b Jul; 91(6): 589-98
- Pschyrembel**, Klinisches Woerterbuch  
Pschyrembel,-W ; Hildebrandt,-H  
257., neu bearb. Aufl.; de Gruyter, 1994
- Rauch,-A**; Pfeiffer-RA; Trautmann-U; Liehr-T; Rott-HD; Ulmer-R  
A study of ten small supernumerary (marker) chromosomes identified by fluorescence in situ hybridization (FISH)  
Clin-Genet. 1992 Aug; 42(2): 84-90
- Rautenstrauss,-B**, Liehr T  
FISH-Technology Springer-labmanual  
Springer, Berlin; 2002
- Rethore,-M-O**; Aurias,-A; Couturier,-J; Dutrillaux,-B; Prieur,-M; Lejeune,-J  
Chromosome 8 : trisomie complete et trisomies segmentaires.  
[Chromosome 8 : complete trisomy and segmental trisomies]  
Ann-Genet. 1977 Mar; 20(1): 5-11
- Ridler,-M-A**, Garrod O, Berg JM.  
A case of Prader-Willi syndrome in a girl with a small extra chromosome.  
Acta Paediatr Scand. 1971 Mar;60(2):222-6
- Rieder,-C-L**; Salmon,-E-D  
The vertebrate cell kinetochore and its role during mitosis  
Trends in Cell Biology. (Vol.8) August 1998
- Rigby,-P-W**; Dieckmann,-M; Rhodes,-C; Berg,-P  
Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.  
J-Mol-Biol. 1977 Jun 15; 113(1): 237-51
- Rineer,-S**; Finucane,-B; Simon,-E-W  
Autistic symptoms among children and young adults with isodicentric chromosome 15  
Am-J-Med-Genet. 1998 Sep 7; 81(5): 428-33
- Rivera,-H**, Vasquez AI, Garcia-Cruz D, Crolla JA.  
Neocentromere at 13q32 in one of two stable markers derived from a 13q21 break.  
Am J Med Genet. 1999 Aug 6;85(4):385-8

**Ronne,-M**

Chromosome preparation and high resolution banding (review)  
In-Vivo. 1990 Nov-Dec; 4(6): 337-65

**Ronney,-D-E; Czepulkowski,-B-H**

Human Cytogenetics- Essential Data  
John Wiley and Sons, Chichester; 1994

**Rosenberg,-H, Singer M, Rosenberg M.**

Highly reiterated sequences of SIMIANSIMIANSIMIANSIMIAN.  
Science. 1978 Apr 28;200(4340):394-402

**Rothenmund,-H; Chudley-AE; Dawson-AJ**

Familial transmission of a small supernumerary marker chromosome 8 identified by FISH: an update  
Am-J-Med-Genet. 1997 Oct 31; 72(3): 339-42

**Röthlisberger,-B; Zerova,-T; Kotzot,-D; Buzhievskaya,-T; Balmer,-D; Schinzel,-A**

Supernumerary marker chromosome (1) of paternal origin and maternal uniparental disomy 1 in a developmentally delayed child  
J-Med-Genet. 2001 Dec; 38(12): 885-8

**Rules and Guidelines for Gene, Allele, and Mutation Nomenclature**

International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice  
Chairperson: Ian Jackson

<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>

**Sachs,-E-S; Van-Hemel,-J-O; Den-Hollander,-J-C; Jahoda,-M-G**

Marker chromosomes in a series of 10,000 prenatal diagnoses. Cytogenetic and follow-up studies  
Prenat-Diagn. 1987 Feb; 7(2): 81-9

**Saiki,-R-K; Gelfand-DH; Stoffel-S; Scharf-SJ; Higuchi-R; Horn-GT; Mullis-KB; Erlich-HA**

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase  
Science. 1988 Jan 29; 239(4839): 487-91

**Sambrook,- J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis**

Molecular Cloning: A Laboratory Manual  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989, 2 nd ed.

**Sasagawa,-I, Nakada T, Ishigooka M, Tomaru M, Sawamura T, Tateno T.**

Cryptorchidism and marker chromosomes: identification of marker chromosomes by fluorescence in situ hybridization.  
Urol Int. 1995;55(1):25-8

**Schinzel,- A**

Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man  
Walter de Gruyter, Berlin (2001)

**Schmid,-M**; Schindler-D; Haaf-T

Structure, origin and effects of a supernumerary marker chromosome 15  
Clin-Genet. 1986 Jul; 30(1): 63-71

**Schröck,-E**, Veldman T, Padilla-Nash H, Ning Y, Spurbeck J, Jalal S, Shaffer LG, Papenhausen P, Kozma C, Phelan MC, Kjeldsen E, Schonberg SA, O'Brien P, Biesecker L, du Manoir S, Ried T.

Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities.

Hum Genet. 1997 Dec;101(3):255-62

**Schröck,-E**; du Manoir,-S; Veldman,-T; Schoell,-B; Weinberg,-J; Ferguson-Smith,-MA; Ning,-Y; Ledbetter,-DH; Bar-Am,-I; Dsoenksen; Garini,-Y; Ried,-T

Multicolor Spectral Karyotyping of Human Chromosomes

Science. Vol.273 (1996)

**Schwab,-M**; Alitalo,-K; Klempnauer,-K-H; Varmus,-H-E; Bishop,-J-M; Gilbert,-F; Brodeur,-G; Goldstein,-M; Trent,-J

Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour

Nature. 1983 Sep 15-21; 305(5931): 245-8

**Seabright,-M**

A rapid banding technique for human chromosomes

Lancet. 1971; II:971-972

**Senger,-G**, Chudoba,- I, Friedrich,- U, Tommerup,- N, Claussen,- U, Brondum-Nielsen,-K.

Prenatal diagnosis of a half-cryptic translocation using chromosome microdissection.

Prenat Diagn. 1997 Apr;17(4):369-74

**Shanske,-A**; Ellison,-J; Vuguin,-P; Dowling,-P; Wasserman,-E; Heinrich,-J; Saenger,-P

Deletion of the pseudoautosomal region in a male with a unique Y;13 translocation and short stature

Am-J-Med-Genet. 1999 Jan 1; 82(1): 34-9

**Sirvent,-N**; Forus,-A; Lescaut,-W; Burel,-F; Benzaken,-S; Chazal,-M; Bourgeon,-A; Vermeesch,-J-R; Myklebost,-O; Turc-Carel,-C; Ayraud,-N; Coindre,-J-M; Pedeutour,-F

Characterization of centromere alterations in liposarcomas

Genes-Chromosomes-Cancer. 2000 Oct; 29(2): 117-29

**Slamon,-D-J**; Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene.

Science. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

**Slovac,-M-L**; Ho,-J-P; Bhardwaj,-G; Kurz,-E-U; Deeley,-R-G; Cole,-S-P-C  
Localization of a novel multidrug resistance associated gene in the HT1080/DR4  
and H69AR human tumor cell lines  
Cancer Res. 1993; 53:3221-3225

**Speicher,-MR**; Ballard,-SG; Ward,-DC  
Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH  
Nature Genetics. Vol 12 april 1996

**Spinner,-N-B**; Grace,-K-R; Owens,-N-L; Sovinsky,-L; Pellegrino,-J-E; McDonald-  
McGinn,-D; Zackai,-E  
Mosaicism for a chromosome 8-derived minute marker chromosome in a patient  
with manifestations of trisomy 8 mosaicism  
Am-J-Med-Genet. 1995 Mar 13; 56(1): 22-4

**Spurbeck,-JL**, Zinsmeister AR, Meyer KJ, Jalal SM.  
Dynamics of chromosome spreading.  
Am J Med Genet. 1996 Feb 2;61(4):387-93

**Stahl,-A**; Hartung,-M; Devictor,-M; Berge-Lefranc,-J-L  
The association of the nucleolus and the short arm of acrocentric chromosomes  
with the XY pair in human spermatocytes: its possible role in facilitating sex-  
chromosome acrocentric translocations  
Hum-Genet. 1984; 68(2): 173-80

**Stankiewicz-P**; Bocian-E; Jakubow-Durska-K; Obersztyn-E; Lato-E; Starke-H;  
Mroczek-K; Mazurczak-T  
Identification of supernumerary marker chromosomes derived from chromosomes  
5, 6, 19, and 20 using FISH  
J-Med-Genet. 2000 Feb; 37(2): 114-20

**Starke,-H**, Schreyer I, Kahler C, Fiedler W, Beensen V, Heller A, Nietzel A,  
Claussen U, Liehr T.  
Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary  
minute marker chromosome 8.  
Prenat Diagn. 1999 Dec;19(12):1169-74

**Starke,-H**, Raida M, Trifonov V, Clement JH, Loncarevic IF, Heller A, Bleck  
C, Nietzel A, Rubtsov N, Claussen U, Liehr T.  
Molecular cytogenetic characterization of an acquired minute supernumerary  
marker chromosome as the sole abnormality in a case clinically diagnosed as  
atypical Philadelphia-negative chronic myelogenous leukaemia.  
Br J Haematol. 2001 May;113(2):435-8

**Starke H**, Mitulla B, Nietzel A, Heller A, Beensen V, Grosswendt G, Claussen U,  
von Eggeling F, Liehr T  
First case of trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11→q11:) plus  
partial uniparental disomy 4p15-16.  
Am J Med Genet. 2003, Vol 116A, pp 26-30.



**Stetten,-G**, Sroka-Zaczek B, Corson VL.

Prenatal detection of an accessory chromosome identified as an inversion duplication (15).

Hum Genet. 1981;57(4):357-9

**Subrt,-I**; Blehova,-B

Robertsonian translocation between the chromosome Y and 15

Humangenetik. 1974; 23(4): 305-9

**Sullivan,-B-A**, Schwartz S.

Identification of centromeric antigens in dicentric Robertsonian translocations: CENP-C and CENP-E are necessary components of functional centromeres.

Hum Mol Genet. 1995 Dec;4(12):2189-97

**Sumner,-A-T**; Evans,-H-J; Buckland,-R-A

New technique for distinguishing between human chromosomes.

Nat-New-Biol. 1971 Jul 7; 232(27): 31-2

**Surralles,-J**; Darroudi,-F; Natarajan,-A-T

Low level of DNA repair in human chromosome 1 heterochromatin

Genes-Chromosomes-Cancer. 1997 Oct; 20(2): 173-84

**Szymanska,-J**; Mandahl-N; Mertens-F; Tarkkanen-M; Karaharju-E; Knuutila-S

Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study

Genes-Chromosomes-Cancer. 1996 May; 16(1): 31-4

**Tanke,-H-J**; Wiegant,-J; van-Gijlswijk,-R-P; Bezrookove,-V; Pattenier,-H;

Heetebrij,-R-J; Talman,-E-G; Raap,-A-K; Vrolijk,-J

New strategy for multi-colour fluorescence in situ hybridisation: COBRA:

COmbined Binary RAtio labelling.

Eur-J-Hum-Genet. 1999 Jan; 7(1): 2-11

**Telenius,-H**, Pelmeur AH, Tunnacliffe A, Carter NP, Behmel A, Ferguson-Smith

MA, Nordenskjöld M, Pfragner R, Ponder BA.

Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted

chromosomes.

Genes Chromosomes Cancer. 1992 Apr;4(3):257-63

**Thangavelu,-M**; Pergament,-E; Espinosa,-R 3rd; Bohlander,-S-K

Characterization of marker chromosomes by microdissection and fluorescence in situ hybridization

Prenat-Diagn. 1994 Jul; 14(7): 583-8

**Tjio,-J-H**, Levan A

The chromosome number of man

Am J Obstet Gynecol.(1956);130:723-724

**Tonk,-V-S**, Kukolich MK, Morgan D, Khan A, Jalal SM.  
Ring chromosome 8 syndrome: further characterization.  
Am J Med Genet. 2000 Jan 17;90(2):162-4

**Tozzi,-C**; Calvieri,-F; Alesi,-L; Neri,-G  
Multiple "marker" chromosomes: a novel cytogenetic finding in a patient with  
mental retardation and congenital anomalies  
Am-J-Med-Genet. 1988 Feb; 29(2): 355-9

**Trask,-B**; van-den-Engh-G; Pinkel-D; Mullikin-J; Waldman-F; van-Dekken-H;  
Gray-J  
Fluorescence in situ hybridization to interphase cell nuclei in suspension allows  
flow cytometric analysis of chromosome content and microscopic analysis of  
nuclear organization  
Hum-Genet. 1988 Mar; 78(3): 251-9

**Trowell,-H-E**; Nagy,-N; Vissel,-B; Choo,-K-H-A  
Long-range analyses of the centromeric regions of human chromosomes 13,14  
and 21: identification of a narrow domain containing two key centromeric DNA  
elements  
Human Molecular Genetics. Vol.2, No.10, 1639-1649, 1993

**Tucker,-JD**, Christensen ML, Carrano AV.  
Simultaneous identification and banding of human chromosome material in  
somatic  
cell hybrids.  
Cytogenet Cell Genet. 1988;48(2):103-6

**Tung,-G**; Covert,-S-M; Malabed,-K-L; Wohlferd,-M-M; Beckerman,-K-P;  
Goldberg,-J-D; Cotter,-P-D  
Minute supernumerary marker chromosomes identified in two patients with a  
related, larger pseudodicentric chromosome  
Am-J-Med-Genet. 2001 Oct 15; 103(3): 193-7

**Turleau,-C**, Chavin-Colin F, de Grouchy J.  
A 45,X male with translocation of euchromatic Y chromosome material.  
Hum Genet. 1980;53(3):299-302

**Uhrig,-S**, Schuffenhauer S, Fauth C, Wirtz A, Daumer-Haas C, Apacik C, Cohen  
M, Muller-Navia J, Cremer T, Murken J, Speicher MR.  
Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications.  
Am J Hum Genet. 1999 Aug;65(2):448-62

**Ulmer,-R**; Pfeiffer,-R-A; Wiest,-E; Goelz,-R; Trautmann,-U  
Multiple (up to seven) different accessory small marker chromosomes: prenatal  
diagnosis and follow-up  
Ann-Genet. 1997; 40(2): 109-14

**v. Eggeling,-F**, Hoppe C, Bartz U, Starke H, Houge G, Claussen U, Ernst G, Kotzot D, Liehr T  
Maternal uniparental disomy 12 in a healthy girl with a 47,XX,+der(12)(:p11→q11:)/46,XX karyotype  
J Med Gen. 2002, Vol 39, pp 519-521

**Van Hooser,-AA**, Mancini MA, Allis CD, Sullivan KF, Brinkley BR.  
The mammalian centromere: structural domains and the attenuation of chromatin modeling.  
FASEB J. 1999 Dec;13 Suppl 2:S216-20

**Vance,-G-H**; Curtis,-C-A; Heerema,-N-A; Schwartz,-S; Palmer,-C-G  
An apparently acentric marker chromosome originating from 9p with a functional centromere without detectable alpha and beta satellite sequences  
Am-J-Med-Genet. 1997 Sep 5; 71(4): 436-42

**van't-Veer,-L-J**; van-der-Feltz-MJ; van-den-Berg-Bakker-CA; Cheng-NC; Hermens-RP; van-Oorschot-DA; Kievits-T; Schrier-PI  
Activation of the mas oncogene involves coupling to human alphoid sequences  
Oncogene. 1993 Oct; 8(10): 2673-81

**Verma,-RS**, Batish SD, Gogineni SK, Kleyman SM, Tetka DG  
Centromeric alphoid DNA heteromorphisms of chromosome 21 revealed by FISH-technique  
Clinical Genetics. 1992; 51:91-93

**Verma,-R-S**, Luke S.  
Variations in alphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique.  
Genomics. 1992 Sep;14(1):113-6

**Verma,-R-S**; Babu,-A  
Human Chromosomes: Principles and Techniques  
2 nd ed., McGraw-Hill, Inc. (1994)

**Vermeesch,-J-R**, Duhamel H, Petit P, Falzetti D, Fryns JP, Marynen P.  
Multiple small accessory marker chromosomes from different centromeric origin in a moderately mentally retarded male.  
Hum Genet. 1999 Dec;105(6):611-8

**Viersbach,-R**, Schwanitz G, Nothen MM.  
Delineation of marker chromosomes by reverse chromosome painting using only a small number of DOP-PCR amplified microdissected chromosomes.  
Hum Genet. 1994 Jun;93(6):663-7

**Viersbach,-R**; Engels H, Gamberdinger U, Hansmann M  
Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients.  
Am J Med Genet. 1998 Apr 1;76(4):351-8

**Voullaire,-L-E**; Slater,-H-R; Petrovic,-V; Choo,- K-H  
A Functional Marker Centromere with No Detectable Alpha-Satellite, Satellite III, or CENP-B Protein: Activation of a Latent Centromere?  
Am-J-Hum-Genet. 52:1153-1163;1993

**Walker,-A-P**; Bocian,-M  
Partial duplication 8q12----q21.2 in two sibs with maternally derived insertional and reciprocal translocations: case reports and review of partial duplications of chromosome 8  
Am-J-Med-Genet. 1987 May; 27(1): 3-22

**Wandall,-A**, Tranebjaerg L, Tommerup N.  
A neocentromere on human chromosome 3 without detectable alpha-satellite DNA forms morphologically normal kinetochores.  
Chromosoma. 1998 Dec;107(6-7):359-65

**Wang-Y**; Minoshima-S; Shimizu-N  
Cot-1 banding of human chromosomes using fluorescence in situ hybridization with Cy3 labeling  
Jpn-J-Hum-Genet. 1995 Sep; 40(3): 243-52

**Warburton,-D**  
Outcome of cases of de novo structural rearrangements diagnosed at amniocentesis  
Prenat-Diagn. 1984 Spring; 4 Spec No69-80

**Warburton,-D**  
De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints.  
Am-J-Hum-Genet. 1991 Nov; 49(5): 995-1013

**Warburton,-P-E**, Cooke HJ  
Hamster chromosomes containing amplified human alpha-satellite DNA show delayed sister chromatid separation in the absence of de novo kinetochore formation  
Chromosoma. 1997 Aug;106(3):149-59

**Watson,-W-J**, Katz VL, Albright SG, Rao KW, Aylsworth AS.  
Monozygotic twins discordant for partial trisomy 1.  
Obstet Gynecol. 1990 Nov;76(5 Pt 2):949-51

**Waye,J-S**; Willard,-H-F  
Chromosome specificity of satellite DNAs: short- and long-range organization of a diverged dimeric subset of human alpha satellite from chromosome 3  
Chromosoma. 97:475-480 (1989)

**Webb,-T**  
Inv dup(15) supernumerary marker chromosomes  
J-Med-Genet. 1994 Aug; 31(8): 585-94

- Wei,-G**, Lonardo F, Ueda T, Kim T, Huvos AG, Healey JH, Ladanyi M.  
CDK4 gene amplification in osteosarcoma: reciprocal relationship with INK4A gene alterations and mapping of 12q13 amplicons.  
Int J Cancer. 1999 Jan 18;80(2):199-204
- Weier,-H-U**; Gray,-J-W  
A degenerate alpha satellite probe, detecting a centromeric deletion on chromosome 21 in an apparently normal human male, shows limitations of the use of satellite DNA probes for interphase ploidy analysis  
Anal-Cell-Pathol. 1992 Mar; 4(2): 81-6
- Willard,-H-F**, Waye JS  
Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA  
Trends in Genomics. 1987; 37: 192-8
- Wilson,-W-D**; Tanious-FA; Barton-HJ; Jones-RL; Fox-K; Wydra-RL; Strekowski-L  
DNA sequence dependent binding modes of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)  
Biochemistry. 1990 Sep 11; 29(36): 8452-61
- Wilton,-L**.  
Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in early human embryos: a review.  
Prenat Diagn. 2002 Jun;22(6):512-8
- Winnacker,-E-L**  
Gene und Klone; Einführung in die Gentechnologie  
VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim. 1985
- Wisniewski,-L**; Hassold,-T; Heffelfinger,-J; Higgins,-J-V  
Cytogenetic and clinical studies in five cases of inv dup(15)  
Hum-Genet. 1979 Sep; 50(3): 259-70
- Wisniewski,-L-P**, Witt ME, Ginsberg-Fellner F, Wilner J, Desnick RJ.  
Prader-Willi syndrome and a bisatellited derivative of chromosome 15.  
Clin Genet. 1980 Jul;18(1):42-7
- Wisniewski,-L-P**; Doherty,-R-A  
Supernumerary microchromosomes identified as inverted duplications of chromosome 15: a report of three cases  
Hum-Genet. 1985; 69(2): 161-3
- Wu,-J-C**, Manuelidis L.  
Sequence definition and organization of a human repeated DNA.  
J Mol Biol. 1980 Sep 25;142(3):363-86.
- Xu,-J**, Fong CT, Cedrone E, Sullivan J, Wang N.  
Prenatal identification of de novo marker chromosomes using micro-FISH approach.  
Clin Genet. 1998 Jun;53(6):490-6

**Yurov,-Y-B**, Mitkevich SP, Alexandrov IA.

Application of cloned satellite DNA sequences to molecular-cytogenetic analysis of constitutive heterochromatin heteromorphisms in man.

Hum Genet. 1987 Jun;76(2):157-64

**Zhang,-J**; Glatfelter AA, Taetle R, Trent JM

Frequent alterations of Evolutionarily Conserved Regions of Chromosome 1 in Human Malignant Melanoma.

Cancer Genet. Cytogenet. 1999; 111(2):119-23

## 8 Abkürzungsverzeichnis

AcroCenM-FISH	Zentromer-M-FISH der akrozentrischen Chromosomen
Aqua Bidest	Zweimal destilliertes Wasser
Aqua dest	einmal destilliertes Wasser
AS	Angelman- Syndrom
AZ	Amniozyten
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BIO	Biotin
BrDU	5-Brom-2-desoxyuridin
CCD-Kamera	Charge-coupled-device- Kamera (= gekühlter, ladungsgekoppelter Bildsensor)
CenM54- FISH	CenM-FISH unter Einbeziehung der Sonde Midi54
cenM-FISH	Zentromer-Multicolor-FISH
Chr.	Chromosom
CM-FISH	Centromeric Multiplex- FISH
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
COBRA	<u>C</u> Ombined <u>B</u> inary <u>R</u> atio Labelling
Cs <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Cäsiumsulfat
Cy3	Cyanine3
Cy5	Cyanine5
Cy5.5	Cyanine5.5
CZ	Choriozyten
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Deoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytosintriphosphat
DEAC	Diethylaminocumarin
dGTP	Deoxyguanidintriphosphat
DIG	Digoxygenin
dmin	double minute chromosome
DNA	Deoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphat; umfaßt dATP, dCTP, dGTP und dTTP
DOP	Degenerate Oligonucleotide Primer
dTTP	Deoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridintriphosphat

FISH	Fluoreszenz in <i>situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTG	<u>G</u> -bands by <u>T</u> rypsin using <u>G</u> iemsa
HSR	Homogeneously Staining Region
KCl	Kaliumchlorid
MCB	Multicolor- Banding
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
M-FISH	Multicolor-FISH mit Ganzchromosomenbanken
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Midi	Mikrodissektion
NaCl	Natriumchlorid
NOR	Nucleolus Organisierende Region
OT	Objektträger
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCP	Partial Chromosome Painting
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase- Kettenreaktion)
PH-	Philadelphiachromosom-
PHA	Phythämagglutinin
PWS	Prader-Willi- Syndrom
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
SG	SpectrumGreen
SKY	Spectral Karyotyping
SMC	Small/ Supernumerary Marker Chromosome (kleines/ zusätzliches Markerchromosom)
SO	SpectrumOrange
SR	SpectrumRed
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA Polymerase
TE	Tris-EDTA- Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Puffer)
tRNA	Transfer- Ribonukleinsäure
U	Unit (= Mengenangabe bei Enzymen)
UPD	Uniparentale Disomie
WCP	Whole Chromosome Painting
YAC	Yeast Artificial Chromosome



## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Geduld zur Anfertigung der vorliegenden Arbeit mit beigetragen haben.

Besonderst danken möchte ich:

- Dem Institutsdirektor der Humangenetik Prof. Dr. U. Claussen für die herzliche Aufnahme im Institut, die Vergabe des Themas, seine Hilfsbereitschaft und Diskussionsfreudigkeit beim Lösen fachlicher Probleme.
- Dr. Thomas Liehr möchte ich danken für die sehr gute Betreuung, die geduldigen Erklärungen und Motivationsversuche, sowie für sein Interesse und seine Hilfsbereitschaft auch außerhalb des fachlichen Bereiches.
- Anita Heller, Dr. Ivan F. Loncarevic, Antje Swoboda, Heike Starke, Monika Ziegler, Isabell Hartmann und Dr. Alma Küchler danke ich für die überaus freundliche Aufnahme in der Arbeitsgruppe, sowie für die Einarbeitung in die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, für das Heranführen an die wissenschaftliche Arbeit, für die geduldige Beantwortung all meiner Fragen, aber auch für die Motivation in Frustrationsphasen.
- Auch allen weiteren Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik danke ich für die freundliche Aufnahme im Institut sowie das Vertrauen und die Geduld, die mir bei der Einarbeitung und Benutzung von Geräten entgegengebracht wurden.
- Bei der Herbert Quandt Stiftung der VARTA AG möchte ich mich für ihre finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums über 5 Monate bedanken.
- Meinen Eltern, Margot und Erhard Nietzel, möchte ich für ihre langjährige und geduldige moralische aber auch finanzielle Unterstützung danken.

- Mein größter Dank gilt Axel Göhlert, der mich in allen Höhen und Tiefen geduldig „ertragen“ und unterstützt hat.
- Großer Dank gilt auch allen externen Labors, welche meine Arbeit durch Einsendung von Zellmaterial unterstützt haben. Im Einzelnen seien hier erwähnt:

Frau Dr. Klemm, Universitäts- Frauenklinik Jena (Fall Nr.1)

Frau Dr. Kähler, Universitäts- Frauenklinik Jena (Fall Nr.2)

Frau Dr. Bartz, Hannover (Fall Nr.3)

Frau Dr. Tittelbach, Nürnberg (Fall Nr.4)

Frau Dr. Küpferling, Cottbus (Fall Nr.5)

Herrn Dr. Viethen, Berchtesgarden (Fall Nr.6)

Herrn Dr. Arnrich, Klinik für Innere Medizin der FSU Jena (Fall Nr.7)

Frau Dr. Wlodarska, Leuven, Belgien (Fall Nr.8)

- Für die in Abb. 4.4 (CenM54-FISH) und in Abb. 4.5 (ArcroCenM-FISH) erwähnten SMC wurden mir freundlicher Weise zwei durch Monika Ziegler, Institut für Humangenetik Jena, bearbeitete Fälle zur Verfügung gestellt.

## 10 Lebenslauf

**Name:** Angela Nietzel

**geboren:** 01.11.1975

**Geburtsort:** München

**Familienstand:** ledig

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulausbildung:** Grundschule in Mosbach/Baden von 1982 bis 1985  
Gymnasium in Ingelheim/Rhein von 1985 bis 1994  
Abitur am 11.06.1994

**Freiwilliges soziales Jahr:** 05.09.1994 - 03.09.1995  
im Altenheim „Ste. Anne d’Auray“ (Châtillon bei Paris)

**Studium:** seit Oktober 1995 Humanmedizin an der Friedrich-Schiller- Universität Jena

**Doktorarbeit:** Experimentelle Arbeiten im Inst. für Humangenetik:  
September 1998 bis Oktober 1999  
Oktober 2001 bis April 2002  
Stipendium der Herbert Quandt Stiftung der VARTA AG  
über 5 Monate

**Prüfungen:** Physikum (August 1997)  
1.Staatsexamen (August 1999)  
2.Staatsexamen (August/ September 2001)

## 11 Publikationsliste

### Buchbeiträge

1. **A Nietzel**, A Heller, H Starke, T Liehr. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). In: FISH-Technology, Springer-labmanual, Springer, Berlin, pp 425-431, ISBN: 3-540-67276-1.
2. T Liehr, **A Nietzel**, M Rocchi, A Heller, H Starke, U Claussen, F v Eggeling. Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) followed by analysis for uniparental disomy - a useful tool in prenatal diagnosis. In: Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother - present state and perspectives. The Karolinum Press, Prag, 2002, pp 293-300, ISBN: 80-246-0397-7.

### Artikel

1. H Starke, I Schreyer, C Kähler, W Fiedler, V Beensen, A Heller, **A Nietzel**, U Claussen, T Liehr. Molecular cytogenetic characterization of a prenatally detected supernumerary minute marker chromosome 8. Prenatal Diagn 1999, Vol 19, pp 1169-1174.
2. **A Nietzel**, M Rocchi, A Heller, H Starke, I Wlodarska, V Beensen, U Claussen, T Liehr. A new multicolor-FISH approach for the characterization of marker chromosomes: Centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH). Hum Genet, Vol 108, pp 199-204.
3. H Starke, M Raida, V Trifonov, J H Clement, IF Loncarevic, A Heller, C Bleck, **A Nietzel**, N Rubtsov, U Claussen, T Liehr. Molecular cytogenetic characterization of an acquired supernumerary minute marker chromosome as sole abnormality in a case clinically diagnosed as Philadelphia negative chronic myelogenous leukaemia. Br. J. Haematol 2001, Vol 113, pp 435-438.
4. A Weise, H Starke, A Heller, H Tönnies, M Volleth, M Stumm, G Senger, **A Nietzel**, U Claussen, T Liehr (2002) Chromosome 2 aberrations in clinical cases characterized by high resolution multicolor banding (MCB) and region specific FISH probes. J Med Genet, Vol 39, pp 434-439.
5. T Liehr, I Schreyer, A Neumann, V Beensen, M Ziegler, I Hartmann, H Starke, A Heller, **A Nietzel**, Claussen. Two more possible pitfalls of rapid prenatal diagnosis using interphase nuclei. Prenat Diagn, 2002, Vol 22, pp 497-499.
6. T Liehr, **A Nietzel**, H Starke, A Heller, A Weise, K Mrasek, U Claussen. Characterization of small human marker chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). ECA-newsletter 2002, Vol 10, pp 3-8.
7. H Starke, B Mitulla, **A Nietzel**, A Heller, V Beensen, G Grosswendt, U Claussen, F von Eggeling, T Liehr (2003) First case of trisomy 21 accompanied by an additional der(4)(:p11→q11:) plus partial uniparental disomy 4p15-16. Am J Med Genet, 2003, Vol 116A, pp 26-30.
8. **A Nietzel**, B Albrecht, H Starke, A Heller, G Gillessen-Kaesbach, U Claussen, T Liehr. Partial hexasomy 15pter→15q13 including SNRPN and D15S10: first molecular cytogenetically proven case report. J Med Genet, in press.
9. T Liehr, **A Nietzel**, H Starke, A Heller, A Weise, A Kuechler, G Senger, S Ebner, T Martin, M Stumm, R Wegner, H Tönnies, C Hoppe, U Claussen, F von Eggeling. Characterization of small marker chromosomes (SMC) by recently developed molecular cytogenetic approaches. J Ass Genet Techn, in press.

### Abstracts

1. **A Nietzel**, H Starke, A Heller, G Senger, U Claussen, T Liehr. Centromere specific 24-color-FISH - a new approach for the characterization of marker chromosomes. Med Genetik 1999; Vol 11, p 132-133 (Abstractnr. W11-6).
2. **A Nietzel**, H Starke, A Heller, W Fiedler, G Senger, E Gebhart, M Rocchi, U Claussen, T Liehr. Characterization of small marker chromosomes by centromere specific 24-color FISH. Cytogenet Cell Genet 1999; Vol 85: p 40 (Abstractnr. P 142).
3. M Ziegler, A Schmidt, **A Nietzel**, H Starke, A Heller, G Senger, U Claussen, T Liehr. Identification and molecular characterization of a prenatally detected maternally inherited supernumerary small ring chromosome 8p. Med Genetik 2000; Vol 12, p 100 (Abstractnr. P-I-4.6).

4. **A Nietzel**, I Wlodarska, A Heller, H Starke, E Gebhart, B Rautenstrauss, M Rocchi, A Hagemeijer, U Claussen, T Liehr. Amplification of centromeric satellite DNA in marker chromosomes with homogeneously staining regions (HSR) identified by centromere-specific 24-color FISH. *Med Genetik* 2000; Vol 12, p 61 (Abstractnr. W9-5).
5. A Heller, **A Nietzel**, M Rocchi, W Fiedler, H Starke, U Claussen, T Liehr. Centromere specific multi-color FISH (cenM-FISH) - a new and rapid method for the identification of marker chromosomes. *Europ J Hum Genet*, 2000, Vol 8 Suppl 1, p 87 (Abstractnr. P-294).
6. A Heller, **A Nietzel**, M Rocchi, H Starke, W Fiedler, U Claussen, T Liehr. The identification of marker chromosomes with a new multi-color FISH technique specific for centromeres. *Cell Mol Biol* 2000, Vol 46, Abstractnr. 90.
7. I Hartmann, H Starke, **A Nietzel**, F Von Eggeling, A Heller, M Rocchi, V Beensen, B Mitulla, U Claussen, T Liehr. Characterization of a small supernumerary marker chromosome by centromere specific multicolor-color FISH (cenM-FISH): case report. *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, p142, Abstractnr. P0210.
8. A Göhlert, I Riemann, **A Nietzel**, N Rubtsov, V Trifonov, U Claussen, T Liehr, K König. A new versatile technique to detect specific sequences within single DNA molecules: Multiphoton multicolor FISH (MM-FISH). *Europ J Hum Genet* 2001, Vol 9/S1, pp142-143, Abstractnr. P0214.
9. T Liehr, **A Nietzel**, M Rocchi, H Starke, A Heller, U Claussen. Centromere specific multicolor FISH (cenM-FISH) – A new approach for the characterization of marker chromosomes. 12<sup>th</sup> Fetal Cell Workshop 2001
10. H Starke, **A Nietzel**, F von Eggeling, A Heller, M Rocchi, V Beensen, U Claussen, T Liehr. Characterization of a small SMC by centromere specific multicolor FISH (cenM-FISH). *Ann Genet* 2001, Vol 44/S1, p161, Abstractnr. 3-600.
11. H Starke, F. v. Eggeling, **A Nietzel**, A Heller, M Rocchi, B Mitulla, V Beensen, U Claussen, T Liehr. Centromere specific multicolor FISH (cenM-FISH) is a versatile method for the characterization of small SMC – case report. *Am J Hum Genet* 2001, Vol 69/S1, p323, Abstractnr 821.
12. H Starke, A Weise, **A Nietzel**, A Heller, U Claussen, T Liehr. A new probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. *Europ J Hum Genet* 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 147; Abstractnr P0346.
13. A Heller, B Albrecht, **A Nietzel**, H Starke, F von Eggeling, U Claussen, T Liehr. Characterization of two small supernumerary marker chromosomes (SMC) by acro/cenM-FISH – first case with partial hexasomy 15pter->15q13. *Europ J Hum Genet* 2002, Vol. 10 Suppl. 1, p 146; Abstractnr P0342.
14. T Liehr, **A Nietzel**, H Starke, A Heller, A Weise, K Mrasek, U Claussen. Straight-forward characterization of small human marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH), high resolution multicolor banding (MCB) and analysis for uniparental disomy (UPD). *The Scand J Clin And Lab Investig* 2002, Vol. 62 Supp 236, pp 19-20.
15. U Steinhäuser, H Starke, **A Nietzel**, J Lindenau, P Ullmann, U Claussen, T Liehr. Suspension fluorescence in situ hybridization (S-FISH) – a versatile technique for interphase analyses. *Med Genetik* 2002; Vol 14, p 334 (Abstractnr. P2-1902).
16. A Heller, B Albrecht, **A Nietzel**, H Starke, F v Eggeling, U Claussen, T Liehr. Characterization of two small supernumerary marker chromosomes by acro/cenM-FISH – first case with partial hexasomy 15pter->15q13. *Med Genetik* 2002; Vol 14, p 334 (Abstractnr. P2-1903).
17. H Starke, A heller, A Weise, **A Nietzel**, U Claussen, T Liehr. A new subcentromeric probe set for the characterization of centromere-near rearrangements. *Med Genetik* 2002; Vol 14, p 262.
18. T Liehr, **A Nietzel**, M Oliver Bonet, H Starke, A Heller, A Weise, F v Eggeling, U Claussen. Characterization of human small marker-chromosomes by centromere-specific multicolor-FISH (cenM-FISH) and high resolution multicolor banding (MCB). *Med Genetik* 2002; Vol 14, p 253.

## 12 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich Schiller Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Arbeit und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: Dr. Thomas Liehr, Dr. Axel Göhlert, Anita Heller, Heike Starke, Dr. Ivan Loncarevic, Prof. Dr. Uwe Claussen,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 12.11.03

Angela Nietzel